# Raccolta di Ricerche sulla Pellagra

pel

Dott. Carlo Ceni

1902 - 1908

# RACCOLTA DI RICERCHE SULLA PELLAGRA

## CARLO CENI.

## 1902 - 1908.

1. Gli aspergilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra. 1902.
2. L'azione del succo gastro-enterico sulle spore aspergillari ... ... „
3. Ueber die Lokalisation der Aspergillussporen i. d. Mesenterialdrüsen. 1903.
4. Le proprietà tossiche dell' *Aspergillus fumigatus* ... ... ... „
5. Sulle proprietà patogene del *Penicillum glaucum* nell' etiologia...... „
6. I penicilli nell' etiologia e patogenesi della pellagra. ... ... „
7. Nuove ricerche sulla pellagra nei polli. ... ... ... ... 1904.
8. Die pathogenen Eigenschaften des *Aspergillus niger* mit Bezug auf die Genese der Pellagra. ... ... ... ... ... ... „
9. Ricerche sperimentali sulla localizzazione anatomica dei sintomi di delirio da tossici pellagrogeni. ... ... ... ... ... 1905.
10. Potere patogeno dell' *Aspergillus ochraceus* ... ... ... ... 1905.
11. Ueber eine neue Art von *Aspergillus varians* ... ... ... 1906.
12. Sulla reazione fenolica in rapporto coi tossici pellagrogeni. · ... „
13. Sul ciclo biologico dei penicilli verdi. ... ... ... ... „
14. Di alcune nuove muffe velenose. ... ... ... ... 1907.
15. Sulle modificazioni dei caratteri fisiologici dei penicilli verdi...... „
16. Ulteriori ricerche sul ciclo biologico dei penicilli verdi...... ... „
17. Di un aspergillo bruno gigante e delle sue proprietà tossiche...... „
18. Sul potere tossico di alcune muffe germaniche cresciute in Italia. „
19. I tossici pellagrogeni in rapporto colle diverse sostanze alimentari e colle stagioni dell' anno. ... ... ... ... ... „
20. Sulla pellagra sperimentale nei polli...... ... ... ... 1908.
21. I veleni delle muffe pellagrogene e le stagioni dell'anno. ... „
22. Principi tossici degli aspergilli *fumigatus* e *flavescens*...... ... 1902.
23. Sulla persistenza del potere vitale e patogeno della spora aspergillare nell' organismo animale. ... ... ... ... ... 1905.



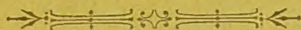





RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXVIII. Fasc. II.

Dott. CARLO CENI
DOCENTE DI NEUROPATOLOGIA - MEDICO SETTORE DELL' ISTITUTO PSICHIATRICO DI REGGIO-EMILIA

# GLI ASPERGILLI NELL' ETIOLOGIA
## E NELLA PATOGENESI DELLA PELLAGRA



RICERCHE SPERIMENTALI, CLINICHE E ANATOMO-PATOLOGICHE

Lavoro comunicato al II. Congresso pellagrologico interprovinciale di Bologna nella seduta del 28 Maggio 1902; pubblicato il 15 Giugno 1902.

*( Con una tavola ).*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXVIII. Fasc. II.

Dott. CARLO CENI
DOCENTE DI NEUROPATOLOGIA - MEDICO SETTORE DELL' ISTITUTO PSICHIATRICO DI REGGIO-EMILIA

# GLI ASPERGILLI NELL' ETIOLOGIA

## E NELLA PATOGENESI DELLA PELLAGRA



RICERCHE SPERIMENTALI, CLINICHE E ANATOMO-PATOLOGICHE

Lavoro comunicato al II. Congresso pellagrologico interprovinciale di Bologna nella seduta del 28 Maggio 1902; pubblicato il 15 Giugno 1902.

*( Con una tavola ).*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.



*Laboratorio anatomo-patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia*

(132. 1 / 616. 969)

# INTRODUZIONE.

Già nella primavera del 1900, allo scopo di poter portare qualche contributo alla patogenesi della pellagra, mi ero proposto un esame batteriologico delle dejezioni di polli che da un anno circa avevo sottoposto, alcuni all' alimentazione di *maiz* sano, altri a quella di *maiz* avariato, pei miei studi sui fenomeni di ereditarietà nell' intossicazione maidica sperimentale (1).

Le mie ricerche, eseguite con varii terreni di coltura, mi avevano ripetutamente dimostrato anzitutto che la flora dei parassiti intestinali appartenenti al gruppo degli schizomiceti (batterî) non presentava notevoli variazioni da pollo a pollo, e che l' alimentazione dei gallinacei continuata per un lungo periodo di tempo con *maiz* avariato oppure con *maiz* sano, non avea grande influenza sul numero e sulla natura dei batterî stessi che abitavano nel loro intestino.

Le forme batteriche contenute nelle feci dei polli che per la prolungata nutrizione con *maiz* avariato presentavano i fenomeni più evidenti di un' intossicazione maidica, furono infatti riscontrati colla stessa frequenza e presso a poco colle stesse proporzioni anche nelle feci dei polli di aspetto perfettamente normale e nutriti con *maiz* sano.

Agli stessi risultati negativi mi avevano portato nell'anno precedente alcune altre ricerche batteriologiche dirette a studiare il contenuto intestinale di cadaveri di individui pellagrosi e non pellagrosi; per quanto io avessi rivolto la mia

attenzione in modo speciale sulle forme di pellagra acuta (tifo pellagroso), come quelle che presentano al tavolo anatomico i fenomeni più evidenti di un' infezione.

Le ricerche eseguite sulle feci dei polli avevano però fino da principio richiamata la mia attenzione sopra alcune forme di parassiti vegetali superiori, le quali, mentre si riscontravano assai di raro e in numero molto scarso nelle dejezioni dei polli normali e nutriti con *maiz* sano, erano invece costanti e abbondantissime nelle dejezioni di polli nutriti con *maiz* avariato.

Questi parassiti vegetali, costanti e numerosi nelle feci dei polli pellagrosi, erano rappresentati esclusivamente da ifomiceti ai quali gli autori fin qui, o negarono ogni importanza etiologica per la pellagra, oppure diedero un' importanza molto relativa. Voglio dire degli *aspergilli*. Parassiti vegetali d' altre specie, specialmente saccaromiceti e mucorinee, furono pure di frequente riscontrati in quegli esami; ma anche queste ultime forme, come gli schizomiceti, si ottenevano indifferentemente, colla stessa frequenza e proporzione, tanto dalle feci dei polli pellagrosi, quanto da quelle dei polli sani.

Queste osservazioni furono il punto di partenza delle attuali ricerche, intraprese nel Febbraio 1901. Ho voluto però continuarle metodicamente nei diversi periodi dell' anno, anche allo scopo di poter stabilire se la presenza dei suddetti parassiti vegetali nell' intestino dei polli, che ora tenevo in osservazione da due anni circa, potesse eventualmente avere rapporti di qualche importanza colle diverse fasi dei fenomeni d' intossicazione maidica che i polli nutriti con *maiz* avariato presentano nelle diverse stagioni dell' anno, come già accennai nella mia nota sopra ricordata sul potere riproduttivo nella pellagra sperimentale.

Inoltre questa volta non ho limitato le mie ricerche alle feci dei polli; ma le ho volute estendere, sempre collo stesso scopo, anche a quelle di individui pellagrosi. Per avere però un termine di confronto l' esame veniva parallelamente praticato pure sulle feci di altri individui scelti tra i ricoverati dell' Istituto, pei quali i dati anamnestici e clinici escludevano assolutamente la pellagra.

Anche queste ricerche sulle feci di individui pellagrosi e non pellagrosi furono poi ripetute in due periodi ben diversi dell' anno, e precisamente nelle due stagioni che corrispondono, secondo i dati statistici, al *maximum* ed al *minimum* che l' endemia pellagrosa presenta nel suo decorso annuale, vale a dire, nella primavera e nell'inverno.

A complemento di queste ricerche rivolte a studiare i rapporti tra i parassiti vegetali abitanti nell' intestino sia dei gallinacei, sia degli uomini, e i fenomeni dell' intossicazione maidica, credetti poi opportuno di iniziare ancora un' altra serie di ricerche sulle sostanze alimentari maidiche, alle quali si deve attribuire l' importanza principale nell' etiologia della pellagra, e per mezzo delle quali era logico supporre che i parassiti dovessero arrivare tanto nell' intestino dei polli, quanto in quello dell' uomo.

Lo scopo principale di queste ricerche era evidentemente quello di vedere se tra i parassiti che vegetano sulle sostanze alimentari che servono di nutrizione prevalente per le classi sociali nelle quali infierisce la pellagra e quelli che avevo riscontrato nell' intestino dei pellagrosi stessi esistessero dei rapporti di qualche importanza. Siccome però uno studio simile nell' uomo potrebbe dare luogo a critiche da parte di coloro che non vorrebbero ammettere un rapporto tra pellagra e *maiz* avariato, così premetto fin d' ora che il valore di questi miei studi lo dovremo anche dedurre dall'analogia dei risultati ottenuti mercè le ricerche sul contenuto intestinale e sulle sostanze alimentari dei polli, pei quali non poteva esistere dubbio alcuno circa il rapporto tra la natura dell' alimentazione stessa e i fenomeni d' intossicazione maidica.

Pei polli in discorso non ci rimaneva infatti che da compiere, parallelamente all' esame delle feci continuato durante l'anno, anche l' esame di quel grano che serviva loro di quotidiana alimentazione, dopo esser stato fatto guastare nel modo seguente:

Il *maiz* fu messo ad avariare in ambienti umidi e poco aereati in quattro diversi periodi dell' anno: nel Gennaio, nel Marzo, nel Luglio, e alla fine di Settembre; mentre invece, nell'anno antecedente, tutto il *maiz* che avea servito per i miei studi era stato messo ad avariare in una sola volta nel mese di Marzo.

Gli effetti sui polli ottenuti nel 1900, furono però gli stessi di quelli ottenuti nel 1901, vale a dire: recrudescenza dei fenomeni di intossicamento maidico a primavera inoltrata, ristabilimento dei polli nell' inverno, ecc.

Per quanto invece concerne lo studio delle sostanze alimentari che avrebbero dovuto rappresentare il veicolo precipuo dei parassiti per arrivare nell' intestimo umano, ho dovuto limitarmi all' esame della polenta, che è la forma più comune sotto la quale la farina di *maiz* viene usata come alimento.

Le ricerche sulla polenta, ripetute metodicamente durante il corso di un anno, come vedremo più avanti, furono poi fatte allo scopo di poter determinare quali fossero le condizioni più favorevoli allo sviluppo dei parassiti, non solo riguardo alle varie fasi dell' anno stesso, ma anche riguardo alle condizioni degli ambienti. Perciò nei varî periodi dell' anno ho distribuito della polenta affettata, preparata con farina sana e quindi sterilizzata all'autoclave in grosse capsule Petri, in ambienti diversi ed opposti dal punto di vista igienico. Parte delle capsule venivano aperte *in situ* e così si lasciavano 15-20 giorni, fino al momento in cui si credeva opportuno di procedere all' esame; il che si deduceva di solito dalle condizioni esteriori. Altre invece di quelle capsule venivano richiuse dopo 12-24 ore; e di quest' ultime, alcune rimanevano *in situ* 15-20 giorni come le prime, per studiare lo sviluppo dei germi alla temperatura ambiente, altre venivano invece messe nella stufa a 38° gradi.

I parassiti che avevano attratta la nostra attenzione, appartengono, come dimostrarono specialmente Kotliar (2), Rénon [a] (3) e A. Obici (4), ai germi che sarebbero incapaci di produrre delle tossine extra-cellulari nei mezzi in cui possono essere coltivati; per cui le mie ricerche, rivolte allo studio di quei parassiti nelle sostanze alimentari e nelle feci dei pellagrosi, avrebbero avuto soltanto un' importanza relativa circa la patogenesi della pellagra, se anzitutto quei germi non fossero stati rinvenuti anche al tavolo anatomico di individui morti coi fenomeni caratteristici della malattia, come pure nei polli

*a)* Rénon avrebbe dimostrato che l' *aspergillus fumigatus* non contiene neppure tossine intra-cellulari; ma su ciò mi fermerò più a lungo in una Nota apposita, nella quale mi riserbo di esporre i risultati di esperienze in corso, fatte specialmente con tinture e con estratti aspergillari.

morti con fenomeni pellagrosi; in secondo luogo, se con questi parassiti non si fosse potuto riprodurre sperimentalmente la malattia stessa negli animali. Queste ultime ricerche però saranno oggetto della seconda parte del lavoro.

La prima parte delle attuali mie ricerche generali si dividerà nei seguenti capitoli:

I. Ricerche dei parassiti nel *maiz* e nella polenta;

II. Ricerche dei parassiti nelle feci di polli, e loro rapporti coll' alimentazione con *maiz* sano e *maiz* avariato;

III. Ricerche dei parassiti nelle feci umane e loro rapporti colla pellagra;

IV. Isolamento dei parassiti nei cadaveri; e lesioni macro- e microscopiche;

V. Isolamento dei parassiti nei polli morti con fenomeni pellagrosi in seguito a nutrizione con *maiz* avariato, e lesioni macro- e microscopiche.

Nella seconda parte del lavoro, che sarà pure rivolta a provare come anche sperimentalmente gli aspergilli possano riprodurre negli animali i fenomeni clinici e le lesioni che si osservano nella pellagra, vedremo anche quale sia la parte che hanno questi parassiti, e quale sia invece la parte che ha il *maiz* nell' etiologia della pellagra.

Questa seconda parte del lavoro fu così divisa:

I. Coltivazione dei parassiti sul *maiz* e loro proprietà patogene in rapporto col *maiz* stesso.

II. Attenuazione dei parassiti coltivati sul *maiz*.

III. Ricerche di confronto.

IV. L' aspergillosi sperimentale prodotta coll' ingestione dei germi e suoi rapporti coll' infezione aspergillare dei pellagrosi.

V. Immunizzazione contro l' aspergillosi sperimentale. Proprietà terapeutiche del siero di animali immunizzati. Primi tentativi di siero-terapia nella pellagra.

VI. Considerazioni epicritiche. Aspergillosi umana comune e aspergillosi nei pellagrosi. Proprietà patogene delle spore aspergillari.

## PARTE I.ª

### Cap. I. — *Ricerche dei parassiti sul maiz e sulla polenta.*

Gli aspergilli sono assai diffusi in natura, come gli altri parassiti vegetali. L'*aspergillus fumigatus* per le sue proprietà patogene è, si può dire, l'unico però tra gli aspergilli sul quale sieno state fatte delle ricerche speciali, sopratutto per stabilire se la sua presenza nelle sostanze alimentari degli animali avesse qualche rapporto coll' aspergillosi degli animali stessi. Rénon (5) segnalò la presenza delle spore del fungo nell' aria, sulla corteccia e sulle foglie degli alberi, sui ciottoli, negli strati superficiali del suolo, sui grani e nella farina di frumento, nonchè sui grani che servono d'alimentazione agli uccelli (miglio, avena, segale e veccia): e concluse che è sulla superficie dei grani dei cereali suddetti che il germe abita di preferenza.

Rénon fece inoltre rilevare come le stagioni calde sieno più favorevoli che le fredde per lo sviluppo del parassita, e con ciò spiega egli i risultati diversi ottenuti col grano di segale in due ricerche ripetute in due anni diversi.

Lucet (6) che rifece a un dipresso le ricerche di Rénon constatò la presenza delle spore d'*aspergillus fumigatus* anche sull'orzo, sul *maiz*, e sui foraggi in genere, sull'erba medica, sul trifoglio, sul fieno, sulla paglia d'avena, di frumento e di segala.

Dalle ricerche di Lucet risulterebbe poi che l'*aspergillus fumigatus* sul *maiz* si riscontra meno di frequente che sui grani d'orzo, di segale e di frumento. Noi vedremo ora come questo sia erroneo, non avendo il Lucet tenuto conto delle diverse condizioni degli ambienti, igieniche o anti-igieniche.

La presenza degli aspergilli sul *maiz* fu poi segnalata anche da quasi tutti gli autori che dal Lombroso in poi si occuparono di pellagra, mettendola in rapporto collo stesso *maiz* avariato. Nessuno di loro però, fino ad oggi, fece sugli aspergilli delle ricerche speciali, non credendo di poter attribuire a questi ifomiceti un'importanza speciale nella patogenesi della malattia.

*Isolamento dei germi dal maiz avariato.* — Il materiale utilizzato per lo studio dei microrganismi sui quali io avevo rivolto la mia attenzione era granturco sano che avevo messo in diversi periodi dell' anno (in Gennaio, in Marzo, in Luglio e in Settembre), come già dissi, ad avariare in un ambiente a pian terreno posto a Nord e poco aereato. Era questo il grano che dovea servire per alimentare i polli d' esperimento di cui parlai più sopra.

Di solito l' esame del grano veniva fatto dopo un mese circa che era rimasto disteso sul pavimento, quando, cioè, parecchie delle cariossidi presentavano delle alterazioni che potevano essere facilmente riconosciute anche a occhio nudo. Lo sviluppo di varî germi, localizzati specialmente sull' ilo delle cariossidi, dava al grano un aspetto variabile dal verde-cupo al verde-grigiastro.

L' esame microscopico, e specialmente le colture fatte coi mezzi nutritivi ai quali già ricorsi per l' esame delle feci, ha però dimostrato che il grano apparentemente mostrava sempre delle alterazioni d' aspetto pressochè identico; invece la natura dei parassiti, per quanto appartenessero nella massima parte agli ifomiceti, variava assai da campione a campione, o, per meglio dire, variava colle diverse epoche dell' anno nelle quali il grano era stato messo ad avariare e veniva poi esaminato.

Nel riassumere questi risultati mi limito qui all'esposizione di quelle forme parassitarie vegetali che più ci interessano:

Nel 1° campione di *maiz* messo ad avariare ai primi di Gennaio ed esaminato nel Febbraio i germi riscontrati più di frequente furono il *penicillum glaucum* misto a delle mucorinee. Assai più raro è stato l' *aspergillus niger* e l' *aspergillus glaucus.* Mancavano assolutamente le altre forme di aspergilli, e precisamente l' *aspergillus fumigatus* e l' *aspergillus flavescens.*

Nel 2° campione di *maiz* messo ad avariare verso la fine di Marzo ed esaminato nell' Aprile e nel Maggio prevaleva sopra qualsiasi parassita e in modo assai accentuato l'*aspergillus fumigatus*, che sotto forma di polvere di colore verde-cupo aderiva all' ilo in circa il 90 % dei grani. In molti casi si rinvenne in colture pure o quasi pure. Mancava l'*aspergillus glaucus*; l'*aspergillus niger* esisteva in proporzioni assai limitate; come pure assai raramente si notò il *penicillum glaucum.*

Nel 3° campione di granoturco messo ad avariare nel Luglio ed esaminato nell' Agosto si rinvenne ancora in abbondanza l'*aspergillus fumigatus*, ma non in proporzioni così grandi come lo si era trovato nel 2° campione. Questo parassita si trovava ora infatti sulle cariossidi dei grani in proporzioni varianti dal 40 % al 50 %. Il *penicillum glaucum* si riscontrò in proporzioni ancora più limitate che nel 2° campione; mentre ora era comparsa un' altra forma di aspergillo, l' *aspergillus flavescens*, che spesso concresceva sull' ilo del grano, misto con altri ifomiceti, specialmente con mucorinee e coll' *aspergillus niger*.

Nel 4° campione di grano messo ad avariare verso la fine di Settembre ed esaminato nell' Ottobre si riscontrò prevalentemente l' *aspergillus flavescens* in proporzioni variabili dal 60 al 70 %; mentre rarissimo fu l'*aspergillus fumigatus*. In questo campione abbondava inoltre anche il *penicillum glaucum* ed era di nuovo ricomparso l' *aspergillus glaucus*, sebbene in proporzioni assai limitate.

*Ricerca dei germi sulle colture di polenta nei diversi ambienti e nei diversi periodi dell' anno.* Quest' ordine di ricerche fu fatto, come già dissi, allo scopo non solo di vedere la potenzialità di sviluppo dei parassiti sulla polenta, nelle diverse epoche dell' anno, ma anche per vedere quali fossero i rapporti, almeno approssimativi, tra l'ambiente e lo sviluppo dei parassiti sulla polenta stessa.

Per questo, in sette epoche ben determinate dell' anno esposi della polenta affettata, preparata con farina sanissima, in diversi ambienti, alcuni di questi ben arieggiati ed esposti a mezzogiorno nelle migliori condizioni igieniche, altri poco aereati, posti a pian terreno, verso ponente e un po' umidi.

In ciascun ambiente le fette di polenta che esponevo, parte erano lasciate tali quali provenivano dalla polenta appena fatta, e queste rimanevano in sito 10-15 giorni, fino a che si doveva esaminarle. Altre fette della medesima polenta venivano invece sterilizzate in grandi capsule Petri e quindi distribuite nei diversi ambienti.

Per ogni ambiente usufruivo così di due capsule, le quali venivano aperte in sito e quindi rinchiuse dopo 12 ore circa. Una di queste capsule veniva poi lasciata chiusa nell'ambiente e l' altra veniva invece messa tosto nella stufa a 38°.

La polenta era esaminata, direttamente al microscopio e colle colture, dopo 10-15 giorni circa che era stata esposta nei diversi ambienti, di solito, quando si vedeva che anche macroscopicamente presentava notevoli avarie per sviluppo di muffe, ecc.

Ecco in breve i risultati di queste ricerche, che furono ripetute in Febbraio, Aprile, Maggio, Luglio, Settembre, Ottobre e Dicembre dell' anno 1901.

I. *Febbraio.* — *a)* Polenta non sterilizzata e lasciata 18 giorni esposta nei diversi ambienti: Il *penicillum glaucum,* misto specialmente a mucorinee e a poche colonie di *sterimatocystis nigra,* prevale su qualsiasi forma parassitaria. Mancano le forme aspergillari. I funghi suddetti sono abbondantissimi in tutti gli ambienti igienici e anti-igienici. Solo negli ambienti igienici e riscaldati artificialmente per uso d' abitazione invernale, il *penicillum* e le mucorinee si riscontrano in proporzioni notevolmente inferiori che in quegli ambienti che durante l' inverno non venivano riscaldati.

*b)* Polenta sterilizzata e lasciata alla temperatura ambiente, chiusa in capsule Petri, dopo 24 ore di esposizione: Risultati come sopra, cioè prevale il *penicillum glaucum,* specialmente negli ambienti non riscaldati per uso di abitazione.

*c)* Polenta sterilizzata esposta per 24 ore nei diversi ambienti e poi messa nella stufa: Rare colonie di *aspergillus fumigatus* si hanno in proporzioni uguali tanto negli ambienti igienici quanto negli anti-igienici. L' *aspergillus flavescens* è invece abbastanza frequente, specialmente negli ambienti poco igienici e riscaldati artificialmente. Il massimo numero di colonie si riscontra nelle stalle e nelle stanze poste a Nord. Questo parassita fu riscontrato invece assai di raro negli ambienti igienici, anche se riscaldati artificialmente, come pure si trovò abbastanza di raro anche in ambienti poco igienici, ma che non erano stati riscaldati.

II. *Aprile.* — *a)* Polenta non sterilizzata e lasciata libera nell'ambiente per 10 giorni: Negli ambienti poco aereati e disposti a Nord si ha lo sviluppo quasi esclusivo dell' *aspergillus fumigatus* le cui colonie sono così numerose da ricoprire già al 5° giorno tutta la superficie superiore della polenta. Questa al 3°-4° giorno appare ad occhio nudo seminata da piccole e numerose colonie biancastre, che poi in breve

ne ricoprono tutta la superficie fondendosi in una patina di color verde cupo. Al 5°-6° giorno in 5 centimetri quadrati della superficie della polenta si contano in media da 40 a 60 colonie del parassita. Assai raro è il parassita negli ambienti igienici, ove si sviluppano invece specialmente delle mucorinee.

*b*) Polenta sterilizzata e lasciata nell'ambiente, chiusa in capsule Petri, dopo 12-20 ore di esposizione: Risultato come sopra, cioè: abbondantissimo e in colture quasi pure è l' *aspergillus fumigatus* in ambienti anti-igienici, e rarissimo negli ambienti igienici.

*c*) Polenta sterilizzata ecc. messa nella stufa dopo un' esposizione di 20 ore negli ambienti: Risultati come sopra. Notisi che in questo mese non fu mai possibile isolare delle forme penicillari.

III. *Maggio.* — *a*) Polenta non sterilizzata e lasciata 8 giorni esposta nei diversi ambienti: I risultati delle ricerche sono a un dipresso gli stessi di quelli ottenuti nel mese precedente; colla diversità che in questo mese l' *aspergillus fumigatus* si sviluppa in proporzioni ancora più imponenti di prima, negli ambienti anti-igienici. In alcuni ambienti anti-igienici, dove lo sviluppo del parassita raggiunge il *maximum*, già al 3.°-4.° giorno si poterono contare 150 e più colonie di *aspergillus fumigatus* sopra una superficie di polenta di circa 5 centimetri quadrati.

Di solito negli ambienti igienici lo sviluppo del parassita nella polenta fu rarissimo; in alcuni ambienti poi mancò assolutamente. Notisi che in questo mese le mucorinee furono pure abbondanti, specialmente negli ambienti anti-igienici, ma il loro sviluppo era sempre impedito dal sopravvento che prendeva l' *aspergillus fumigatus*.

*b*) Polenta sterilizzata, lasciata nell'ambiente, chiusa in capsula Petri dopo 15 ore di apertura della medesima: I risultati sono ancora gli stessi, cioè: enorme sviluppo dell' *aspergillus fumigatus* negli ambienti anti-igienici e limitatissimo negli ambienti igienici.

*c*) Polenta sterilizzata e messa nella stufa dopo di essere stata esposta 12 ore nei diversi ambienti: Risultati come sopra.

IV. *Luglio.* — I risultati di questo mese sono molto simili a quelli ottenuti nel Maggio, apparendo sempre abbondantissimo l'*aspergillus fumigatus* negli ambienti anti-igienici e scarsissimo in quelli igienici. In questo mese però, specialmente negli ambienti anti-igienici, lo sviluppo delle mucorinee in genere è così imponente e rapido, che queste prendono presto il sopravvento sugli aspergilli.

In questo mese inoltre insieme all' *aspergillus fumigatus* si riscontra anche qualche colonia di *aspergillus flavescens*, e di preferenza sempre negli ambienti poco igienici.

Anche in questo mese mancano le forme penicillari.

Questi risultati sono eguali e costanti tanto sulla polenta non sterilizzata e lasciata negli ambienti per più giorni, quanto su quella sterilizzata e che era stata esposta negli ambienti stessi per sole 12–15 ore.

V. *Settembre.* — *a*) Sulla polenta non sterilizzata e lasciata 14 giorni esposta negli ambienti manca assolutamente lo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus* tanto negli ambienti igienici quanto in quelli anti-igienici. Abbondante e rigoglioso è stato invece lo sviluppo dell' *aspergillus flavescens* e del *penicillum glaucum*, specialmente negli ambienti umidi e poco aereati. Questi due parassiti prendono di solito il sopravvento sulle altre forme parassitarie, di modo che la polenta dopo 10–15 giorni appare coperta di una patina umida, a macchie di diverso colore, ma prevalentemente bluastre, date dal *penicillum* e da macchie color verde-giallastro date dall' *aspergillus flavescens.*

Negli ambienti igienici i due suddetti parassiti sono assai più rari, e di essi quello che prevale è spesso il *penicillum glaucum.*

*b*) Polenta sterilizzata ed esposta per 20 ore negli ambienti: Risultati come sopra.

*c*) Polenta esposta per 20 ore nei diversi ambienti e messa nella stufa: Nei diversi campioni di polenta si sviluppa ancora l' *aspergillus fumigatus* unito al *flavescens.* Quest' ultimo però di solito è in proporzioni maggiori al primo. I due parassiti si riscontrano in tutti gli ambienti, ma sempre prevalentemente in quelli poco igienici. Lo sviluppo

dell' *aspergillus fumigatus* è però ovunque di gran lunga inferiore a quello osservato nei mesi di Aprile, Maggio, e Luglio. In media sopra una superficie di 5 centim. quadrati di polenta si sviluppano una e al massimo due colonie.

VI. *Ottobre* — *a*) Sulla polenta non sterilizzata e lasciata esposta negli ambienti per 18 giorni prevale ovunque il *penicillum glaucum*, il quale abbonda specialmente negli ambienti poco igienici. Manca ovunque l' *aspergillus fumigatus*. L' *aspergillus flavescens* si riscontra ancora di frequente, specialmente negli ambienti poco igienici, ma vegeta meno rigoglioso che nel mese precedente. Si riscontra invece in qualche ambiente l'*aspergillus glaucus*, che vegeta rigoglioso, come pure l' *aspergillus niger*.

*b*) Sulla polenta sterilizzata ed esposta negli ambienti per 24 ore e poi lasciata *in situ*, chiusa in capsule Petri, si hanno gli stessi risultati avuti colla polenta rimasta esposta per 18 giorni.

*c*) Sulla polenta esposta nei diversi ambienti per 24 ore e poi messa nella stufa si trovano: Rare colonie di *aspergillus fumigatus* negli ambienti tanto igienici, quanto anti-igienici; abbondanti colonie di *aspergillus flavescens* specialmente in ambienti poco igienici.

VII. *Novembre*. — *a*) Sulla polenta esposta negli ambienti per 17 giorni il *penicillum glaucum* è sempre il parassita che prende il sopravvento sugli altri, ed abbonda specialmente negli ambienti poco igienici. Mancano ovunque l' *aspergillus fumigatus* e il *flavescens*. In qualche ambiente si sviluppano poche colonie di *aspergillus glaucus* e di *aspergillus niger*.

*b*) Sulla polenta lasciata esposta per 24 ore i risultati sono a un dipresso uguali ai primi.

*c*) Sulla polenta esposta per 24 ore negli ambienti e poi messa nella stufa si ha l' *aspergillus fumigatus* in proporzioni assai scarse, e lo si trova specialmente negli ambienti poco igienici. Lo si riscontra, però, sebbene sempre in proporzione limitatissima, anche in alcuni ambienti igienici, nei quali prima, nella primavera e nell' estate, spesso non si era riscontrato affatto.

È inutile che faccia notare come la diversità dei risultati ottenuti nelle stagioni fredde colla polenta lasciata negli ambienti e con quella portata nella stufa, dipende dal diverso grado di temperatura, più o meno favorevole per lo sviluppo di un parassita, piuttosto che di un altro; perciò noi dovremo tener conto costantemente degli uni e degli altri reperti.

## Cap. II. — *Ricerche sulle feci dei polli.*

Per le ricerche sulle feci dei polli approfittai, come già dissi, del materiale di studio che da lungo tempo tengo in osservazione per le mie esperienze sulla ereditarietà pellagrosa e per altre esperienze affini.

I polli che mi servirono per le attuali ricerche sono divisi in sei pollai distinti, e da due a tre anni sono nutriti nel modo seguente: I soggetti dei primi due pollai furono costantemente alimentati con *maiz* prevalentemente avariato; quelli del terzo pollaio ebbero invece una alimentazione mista, ma prevalentemente con *maiz* sano, escluso sempre in modo assoluto il *maiz* avariato.

Per gli altri pollai l' alimentazione è sempre stata mista (erbaggi, residui di pane, ecc.), e non si può sempre escludere che unitamente anche a *maiz* sano, sia stato somministrato del *maiz* avariato. Inutile dire che i polli dei due primi pollai presentavano fenomeni di intossicazione maidica. Le ricerche sulle feci raccolte da questi pollai furono ripetute per 6 volte in un anno a periodi di distanza di due mesi, come si vedrà qui appresso. Le feci furono raccolte sempre fra le più fresche della giornata e seminate poi abbondantemente in tubi con liquido di Raulin, e su patate lasciate qualche tempo nello stesso liquido di Raulin.

Di solito per ciascun pollaio ho seminato 8 tubi, dei quali 4 con liquido Raulin e 4 colle patate.

I risultati di queste ricerche li possiamo riassumere nel modo che segue:

I. *Gennaio 1901* — Sopra 16 colture fatte colle feci provenienti dai due pollai forniti con *maiz* guasto abbiamo: tre colture pure di *aspergillus flavescens*, e una mista con *aspergillus fumigatus*.

Nelle altre colture si svilupparono dei *saccharomices*, delle mucorinee, ecc. ma nessuna forma penicillare.

Le 32 colture provenienti dai polli pei quali era esclusa la nutrizione con *maiz* guasto ci diedero: due colture con *aspergillus flavescens* e una con *aspergillus fumigatus*, e tutte le altre colture contenevano mucorinee, saccaromiceti e una sola coltura il *penicillum glaucum*.

II. *Marzo.* — Delle 16 colture fatte colle feci provenienti dai polli nutriti con *maiz* guasto, in 7 si sviluppa abbondante l'*aspergillus fumigatus* e in 3 l'*aspergillus flavescens*. In tutte le altre si sviluppano saccaromiceti e mucorinee. Mancano forme penicillari.

Le 32 colture fatte con feci dei polli nutriti con *maiz* sano ecc. ci dànno: 3 colture con sviluppo di *aspergillus fumigatus*, 5 con sviluppo di *aspergillus flavescens*. In tutte le altre si sviluppano delle mucorinee e dei *saccharomices*, mentre mancano sempre forme penicillari.

III. *Maggio.* — In tutte le 16 colture fatte con materiale proveniente dai polli pellagrosi si sviluppa rigoglioso, abbondantissimo e di solito in coltura pura, l'*aspergillus fumigatus*.

Delle 32 colture fatte con feci di polli normali in due sole si sviluppa l'*aspergillus fumigatus*. In tutte le altre colture si sviluppano delle mucorinee e dei saccaromiceti come al solito.

IV. *Luglio.* — I risultati sono a un dipresso come quelli del Maggio, cioè: L'*aspergillus fumigatus* è abbondantissimo in tutte le 16 colture fatte con feci di polli pellagrosi, e assai scarso nelle colture fatte con feci di polli sani. Le feci di questi ultimi non ci diedero che quattro casi positivi.

V. *Settembre.* — Delle 16 colture fatte con feci di polli pellagrosi in 5 sole si sviluppa l'*aspergillus fumigatus*. In 4 colture si sviluppa invece l'*aspergillus flavescens*, mentre in tutte le altre si sviluppano le solite mucorinee, i saccaromiceti e mancano però sempre le forme penicillari.

Le 32 colture fatte con feci di polli normali ci danno: 3 casi di *aspergillus fumigatus* e 4 di *aspergillus flavescens*, misti spesso all' *aspergillus niger*. Abbondano in tutte le altre

culture le mucorinee e i saccaromiceti, senza però alcuna forma penicillare.

VI. *Novembre.* — Nelle 16 colture fatte con feci di polli pellagrosi manca assolutamente la presenza dell' *aspergillus fumigatus;* mentre su 11 di esse si sviluppa rigoglioso l' *aspergillus flavescens.* Più varie del solito sono le mucorinee e gli altri funghi comuni. Mancano sempre le forme penicillari.

Delle 32 colture di controllo in due si sviluppa l' *aspergillus flavescens.* Rare sono le mucorinee e i saccaromiceti. In due casi si sviluppa il *penicillum glaucum.*

È inutile ch' io faccia ora rilevare l' importanza dei reperti qui riassunti, dai quali appare evidente che l' *aspergillus fumigatus* e l' *aspergillus flavescens* si possono considerare i soli parassiti vegetali che si riscontrano in modo costante e in numero considerevole nel contenuto intestinale dei polli nutriti in special modo con *maiz* guasto.

Più avanti vedremo l' enorme resistenza dei gallinacei all' azione patogena di questi parassiti; per ora mi accontento di richiamare l' attenzione sull' alternarsi della preponderanza dell' una e dell' altra specie di questi due ifomiceti nelle diverse epoche dell' anno; giacchè anche da questo punto della questione i risultati delle ricerche sulle feci dei polli corrispondono esattamente a quelli delle ricerche batteriologiche fatte direttamente sul *maiz* e sulla polenta esposti negli ambienti anti-igienici, dei quali abbiamo già dato un riassunto nel capitolo precedente.

## Cap. III. *Ricerche dei parassiti nelle feci umane di individui pellagrosi e non pellagrosi.*

Le ricerche sulle feci dei nostri ricoverati pellagrosi e non pellagrosi furono ripetute in due periodi dell' anno ben distinti; cioè dal Maggio al Giugno 1901 e dal Novembre al Dicembre dello stesso anno.

La raccolta delle feci veniva eseguita in vasi previamente sterilizzati e la seminagione del materiale di ciascun individuo veniva fatta abbondantemente e distribuita in 6 tubi, parte con patate preparate col liquido Raulin e parte con solo liquido Raulin.

Dai primi del mese di Maggio a tutto Giugno furono esaminate le feci di 154 individui. Di questi, 15 erano pellagrosi, e per la massima parte entrati nell' Istituto da poco tempo e con disturbi intestinali (diarrea o stitichezza ostinata), e gli altri 139 casi erano costituiti in piccola parte dal personale di servizio e tutti gli altri da ricoverati pei quali con certezza si escludeva la pellagra.

Orbene, dalle feci dei 15 pellagrosi in 10 casi si sviluppò abbondante l' *aspergillus fumigatus*.

Dalle feci dei 139 individui non pellagrosi in 5 casi si isolò l' *aspergillus fumigatus*, mentre tale parassita non si rinvenne affatto negli altri 134. Per quanto riguarda i 5 casi di individui non pellagrosi e le cui feci contenevano l' *aspergillus fumigatus*, debbo far qui notare che uno era rappresentato da una contadina, affetta da una forma mentale periodica, entrata nell' Istituto da circa un mese, e che proveniva da luoghi infetti da pellagra; tre altri casi erano rappresentati da tre donne (un' epilettica, una paranoica e una periodica) che passavano la notte e la massima parte della giornata in una stessa camera posta a Nord. L' esame delle feci di queste 3 donne fu ripetuto 4 volte in 4 giorni differenti e a breve distanza, solo nel caso dell'epilettica si riscontrò l'*aspergillus fumigatus* costantemente e abbondantissimo, e quest'inferma ebbe durante tutto questo periodo abbondanti scariche diarroiche e sanguinolente.

Il quarto caso di individui non pellagrosi e aventi l'*aspergillus fumigatus* nelle feci si riferiva ad un inserviente dei Laboratorî adibito alle manipolazioni del *maiz* e alla custodia dei pollai. Ripetuto però l'esame in questo soggetto, dopo due settimane, esso risultò negativo.

La seconda volta l'esame delle feci fu rifatto nel periodo di tempo compreso dai primi di Novembre fino alla metà di Dicembre. Ora però non si esaminarono che le feci di 90 individui, dei quali 9 erano pellagrosi e gli altri 81 non pellagrosi.

I risultati di quest' ultime ricerche sarebbero in contraddizione con quelli che abbiamo ottenuto nella primavera; giacchè dalle feci dei 9 pellagrosi in un caso solo si ottenne lo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus*; avendo gli altri 8 casi dato risultati negativi. Dalle feci degli 81 individui non pellagrosi si ebbe invece in 5 casi lo sviluppo dell'*aspergillus*

*fumigatus* puro, in 2 casi lo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus* misto all' *aspergillus flavescens*, e in 4 casi lo sviluppo dell' *aspergillus flavescens* puro.

Fo qui notare che in questa stagione le feci che diedero luogo allo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus* provenivano tutte da individui appartenenti a una sola Sezione, e precisamente alla Sezione agricola.

L' *aspergillus flavescens* invece fu rinvenuto nelle feci di 2 casi soltanto di quelli che appartenevano alla Sezione agricola; mentre gli altri 4 casi che diedero luogo allo sviluppo dell'*aspergillus flavescens* erano costituiti da individui appartenenti ad altre Sezioni.

Dalle feci degli altri individui non pellagrosi che non diedero luogo a sviluppo di aspergilli si ottennero come il solito mucorinee e saccaromiceti; ma in numero assai inferiore a quelli che si ottennero nella primavera. In due casi inoltre si ebbe lo sviluppo del *penicillum glaucum*.

Solo più avanti, nella seconda parte di questo lavoro riguardante gli studì sperimentali, apparirà l' importanza dei risultati qui riassunti sulla presenza degli aspergilli nelle feci di individui pellagrosi e non pellagrosi; giacchè noi vedremo allora che se il tubo gastro-enterico deve certo rappresentare la via principale d' entrata dei parassiti nell' organismo dei pellagrosi, non rappresenta però esso la sede principale di elaborazione dei tossici dei parassiti stessi.

Qui fo solo rilevare la frequenza degli aspergilli patogeni anche nelle feci umane e la preponderanza che nella stagione estiva si ha di essi nelle feci degli individui pellagrosi e degli individui provenienti da località infette da pellagra.

## Cap. IV. — *Isolamento dei germi dai cadaveri di pellagrosi e reperti macro- e microscopici. — Valore dei reperti.*

Le mie ricerche fatte allo scopo di poter determinare se nei cadaveri di pellagrosi esistessero gli ifomiceti che già avevano richiamato la nostra attenzione per la fase della loro evoluzione annuale e pel loro potere patogeno in rapporto al *maiz* e al suo uso come sostanza alimentare, furono ripetute parallelamente anche su cadaveri di individui pei quali i dati

anamnestici e clinici escludevano in modo assoluto la presenza della pellagra.

Il resoconto di queste ricerche ch' io dò ora si riferisce perciò al reperto ottenuto sopra 73 cadaveri, dei quali 28 erano di individui diagnosticati in vita come sicuramente pellagrosi e 3 di individui morti di frenosi acuta e con diagnosi incerta. Gli altri 42 cadaveri appartenevano a individui pei quali invece ogni dato anamnestico e clinico escludeva con sicurezza la pellagra.

Le autopsie di tutti questi cadaveri furono eseguite nel periodo di tempo che decorre dal primo Aprile 1901 fino al Maggio 1902, e le ricerche parassitarie furono sempre fatte con numerose colture, seminando abbondantemente il materiale che ottenevo dai cadaveri per mezzo di raschiature delle varie parti e dei diversi organi dei medesimi.

Il numero delle colture si è sempre aggirato sulle 40 e più per ciascuna autopsia, ed esse venivano fatte, parte direttamente in liquido di Raulin, e parte su patate preparate nel modo su indicato.

Orbene, le colture fatte dai 42 cadaveri pei quali in vita si era esclusa con sicurezza la pellagra diedero costantemente risultati negativi, vale a dire, da nessun organo di questi cadaveri si potè isolare alcun ifomiceta degno della nostra attenzione. Soltanto in un caso di un contadino, entrato di recente nell' Istituto e morto nel Giugno 1901 di forma acuta, si era isolato l'*aspergillus fumigatus* dal contenuto intestinale.

In questi 42 casi al tavolo anatomico si fecero poi rispettivamente le diagnosi di periencefalite, di nefrite, di setticemia per piaghe da decubito in marasmatici, di tubercolosi polmonare diffusa, ecc.

Ben diversi furono invece i risultati delle ricerche batteriologiche fatte sui 28 cadaveri di individui morti di pellagra.

Clinicamente la malattia in 6 di questi casi ebbe un decorso acuto coi fenomeni caratteristici del tifo pellagroso, cioè: forte ipertermia; tono muscolare aumentato fino a presentare uno stato di vera rigidità tetanica; forti scosse e sussulti muscolari diffusi a tutto il corpo e specialmente agli arti; gravi disturbi psichici; sitofobia; ecc.

Di questi 6 casi 4 vennero al tavolo anatomico nei mesi di Maggio e Giugno 1901, 2 nel Maggio 1902.

In 14 casi invece il decorso clinico della malattia fu sub-acuto, o per meglio dire, gli infermi, già affetti da pellagra cronica, morirono poi con fenomeni di una riacutizzazione, caratterizzata di solito da lievi ipertermie, da paresi spastica agli arti inferiori, da aumento del tono muscolare, da tremori con atassia agli arti superiori, da contratture e lievi scosse muscolari limitate specialmente agli arti, da sitofobia e da disturbi psichici, meno gravi però che nelle forme acute.

La massima parte delle autopsie di queste forme fu fatta nell' autunno 1901.

Negli altri 8 casi la malattia ebbe un decorso cronico e gli infermi morirono in uno stato marasmatico, senza elevazione di temperatura e senza alcun fenomeno grave e caratteristico. Solo negli ultimi giorni di vita si era notato in essi un lieve aumento del tono muscolare e qualche contrattura, spesso affatto transitoria, degli arti, specialmente dei superiori.

*Casi di pellagra acuta* (*tifo pellagroso*).

Reperto anatomo-patologico: Forte congestione generale di tutti gli organi interni e in modo speciale della pia, delle pleure e dei polmoni. I polmoni, oltre allo stato di accentuata congestione, presentavano delle emorragie sotto-pleuriche, e in 4 casi esistevano dei veri focolai emorragici diffusi nello stesso parenchima polmonare. I bronchi erano ingombri di muco denso e vischioso, d'odore nauseante, specialmente in un caso, e la loro mucosa era fortemente arrossata.

Le pleure, che, come dissi, erano fortemente congeste in tutti i casi, in 5 di questi presentavano i caratteri d' una pleurite fibrinosa adesiva, con formazione di aderenze e pseudomembrane di data recentissima, esili, assai iniettate e d' aspetto spesso gelatinoso e localizzate specialmente nei solchi interlobari.

In 4 di questi casi infine la pia meninge, oltre ad essere congesta, era lievemente opacata e qua e là seminata da chiazze d' aspetto gelatinoso con tutti i caratteri di un processo infiammatorio acuto diffuso. I ventricoli laterali in questi 4 casi contenevano poche goccie di liquido siero-sanguinolento.

Reperto batteriologico: Dei sei casi di tifo pellagroso, cinque hanno dato un reperto positivo e uno negativo.

I casi con reperto positivo erano tutti rappresentati da individui morti repentinamente dopo pochi giorni che erano entrati nell' Istituto, e che avevano avuto un breve periodo comatoso, preagonico, susseguito ai fenomeni acuti e che avea durato da uno a due giorni circa.

Riassumo qui in breve il risultato dell' esame colturale fatto dai varî organi, riserbandomi di esporre a suo tempo più dettagliatamente i reperti di ogni singolo caso.

Le seminagioni fatte abbondantemente con frammenti delle sierose suddette (pia meninge e pleure) che macroscopicamente presentano le lesioni più importanti, hanno dato luogo quasi sempre allo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus.* Lo sviluppo del parassita si ottenne in modo particolare dall' essudato fibrinoso e dalle seminagioni fatte colle pseudo-membrane di formazione più recente, e si presentò ora più rigoglioso e abbondante nelle colture fatte colle pleure, ora invece più abbondante in quelle fatte colla pia meninge. In uno di questi cinque casi non si isolò il parassita dalla pia, mentre fu abbondantissimo il germe isolato dalle due pleure, come invece fu abbondantissimo il parassita isolato dalla pia in due casi nei quali era stato piuttosto scarso nelle colture provenienti dalle pleure.

Nei primi 4 di questi casi positivi l' *aspergillus fumigatus* fu isolato in coltura pura, sia dalla pia meninge, sia dalle pleure; mentre nel 5° caso si è isolato dalla pia meninge il *fumigatus* misto all' *aspergillus flavescens,* e dalla pleura misto all' *aspergillus niger.* Tanto l' *aspergillus flavescens* quanto l' *aspergillus niger* però erano assai scarsi e rappresentavano una quantità minima di fronte alle numerose colonie di *aspergillus fumigatus.*

Dal parenchima polmonare fortemente congesto in soli 3 casi si è potuto isolare l' *aspergillus fumigatus* in quantità assai meno abbondante di quello ottenuto dalle pleure e dalla pia meninge; dal fegato e dalla milza fu isolato l' *aspergillus fumigatus* soltanto in un caso, e ivi fu riscontrato ancor più scarso che nel parenchima polmonare. Dal sangue non fu mai isolato, e dal contenuto intestinale fu isolato una volta sola.

Nel sesto caso, morto nel Giugno 1901 e dopo un periodo di 14 giorni di uno stato marasmatico, susseguito alla scomparsa dei fenomeni acuti e tipici del tifo pellagroso, il reperto

batteriologico fu completamente negativo. In 43 colture fatte dai varî organi non si è mai sviluppato alcun ifomiceta.

*Casi di pellagra sub-acuta.*

Il reperto anatomo-patologico dei 14 casi che morirono con fenomeni di pellagra riacutizzata lo possiamo riassumere come segue:

Le meningi e la sostanza cerebrale sono di solito iniettate. La pia meninge in qualche caso presenta un lieve opacamento diffuso. In due casi la pia, quella di un lato specialmente, è congesta, fortemente opacata e d' aspetto gelatinoso.

Il processo flogistico sub-acuto della meninge è in un caso accompagnato inoltre da un' emorragia sotto-meningea di data recente, che aveva determinato la morte repentina dell' infermo. In ambedue questi casi nei ventricoli laterali esiste del liquido siero-sanguinolento e la tela coroidea è fortemente congesta ed inspessita. (Questi due casi negli ultimi giorni di vita avevano presentato fenomeni cerebrali localizzati).

Polmoni: Qualche volta congesti, di solito presentano i caratteri di un edema sub-acuto. I bronchi di solito non presentano nulla di notevole; in qualche caso però hanno la mucosa congesta e sono ripieni di catarro vischioso.

Pleure: In tutti i casi si hanno caratteri molto accentuati di una pleurite fibrinosa adesiva acuta, e più spesso ancora riacutizzata, e localizzata di solito ad un lato.

Due furono i casi di pleurite fibrinosa acuta, coi seguenti caratteri: lievi aderenze pleuriche, costituite da tessuto fibrinoso fortemente congesto e delicato. Le pleure viscerale e parietale in corrispondenza dell' essudato fibrinoso sono lievemente inspessite e fortemente congeste per una zona limitata a $^1/_5$ o a $^1/_4$ circa della superficie pleurica, in corrispondenza del lobo inferiore. In un caso il processo flogistico, a sinistra, si è diffuso anche al mediastino e al pericardio, che pure appaiono fortemente iniettati, inspessiti e d' aspetto gelatinoso. Negli altri 12 casi si ebbero i caratteri di una pleurite adesiva cronica riacutizzata, di solito unilaterale, con diffuse e robuste aderenze di data antica, frammiste a aderenze esili e assai congeste. Le pleure fortemente inspessite e ricoperte da

pseudo-membrane, parte pure di data antica, parte di data recente, congeste e fibrinose e d'aspetto gelatinoso. In due casi questo processo era diffuso anche al pericardio viscerale e parietale, che, come la pleura, appariva fortemente inspessito e ricoperto da pseudo-membrane neoformate, congeste e d'aspetto gelatinoso. Nella cavità pericardica esisteva del liquido siero-sanguinolento ma in poca quantità. In un caso le pleure erano ricoperte da piccole granulazioni neoformate e rossastre, che avevano l'aspetto di una forma specifica tubercolare. Non fu però possibile dimostrare la presenza del bacillo di Koch, e in questo caso mancavano traccie di tubercolosi in qualsiasi parte del corpo.

In uno di questi casi infine l' inspessimento della pleura mediastinica era accentuatissimo, e la parte più periferica del polmone (lobo inferiore sinistro) in corrispondenza della pleura inspessita presentava numerosi noduli della grossezza di un pisello, biancastri nel loro interno e di consistenza quasi cartilaginea.

Cuore: Di solito con degenerazione grassa del miocardio, e qualche volta con un inspessimento diffuso dell' endocardio.

Milza: Generalmente un po'atrofica, e resistente al taglio.

Fegato: Spesso con un lieve grado di degenerazione grassa e null' altro di notevole.

Intestino: Le pareti intestinali generalmente presentavano un notevole grado di atrofia. Alle volte però l' atrofia dell' intestino è poco notevole e in questi casi esiste invece una forte congestione limitata specialmente a zone ben nette.

Reni: Qualche volta presentano i caratteri di una nefrite interstiziale cronica, qualche volta invece non presentano nulla di notevole, tranne un semplice stato di congestione. In un caso però si ebbero delle vere emorragie puntiformi in corrispondenza dello strato glomerulare.

Reperto batteriologico: In due casi soltanto su 14 il reperto fu negativo. Nessuna forma parassitaria si è potuta isolare dai loro varî organi, compreso l' intestino e la pleura. Negli altri 12 casi invece il reperto fu positivo essendosi isolato quasi sempre in coltura pura, e abbondante ora l' *aspergillus fumigatus*, ora l' *aspergillus flavescens*.

L' *aspergillus fumigatus* fu isolato in coltura pura e abbondantissimo dalla pleura e dal pericardio di un pellagroso

morto alla fine dell' Aprile 1901 e in due morti nel Gennaio 1902. Di questi il primo al tavolo anatomico presentava i caratteri d'una pleurite e pericardite fibrinosa sub-acuta tipica. Gli altri due casi presentavano i caratteri di una pleurite unilaterale cronica riacutizzata. Nel primo caso il parassita si è isolato, in proporzioni però alquanto inferiori, anche dal parenchima polmonare, dal fegato e dal contenuto intestinale, mentre negli altri due si isolò solo dalle pseudo-membrane pleuriche.

Negli altri pellagrosi, morti nel periodo di tempo che va dalla fine di Maggio a tutto Dicembre 1901, si è isolato in colture pure l' *aspergillus flavescens*. Questo parassita si isolò costantemente e abbondantissimo dalla pleura, e precisamente da quelle zone che presentavano un processo flogistico acuto o sub-acuto. Si isolò l' *aspergillus flavescens* abbondantissimo e in coltura pura dal pericardio tanto viscerale quanto parietale in quei tre casi in cui si ebbero i caratteri di una pericardite acuta. Lo stesso parassita si isolò in coltura pura dall' essudato siero-fibrinoso sotto-meningeo nei due casi in cui si erano osservati all' autopsia i caratteri di un processo flogistico sub-acuto delle pie meningi. Nel caso sopra citato con focolaio emorragico sottomeningeo le colture fatte dallo stesso focolaio emorragico diedero pure luogo allo sviluppo del parassita. Lo stesso parassita si isolò egualmente anche dalla tela coroidea del secondo caso sopra citato che al tavolo anatomico avea presentato un forte turgore della stessa tela coroidea. Questo malato nel periodo agonico, durato circa 24 ore, avea dato segni di gravi fenomeni cerebrali sorti d' improvviso.

In questi casi l' *aspergillus flavescens* si isolò in coltura pura, ma in proporzioni assai più limitate, una volta dal parenchima polmonare, due volte dal fegato e una volta dalla milza. Dal contenuto intestinale si isolò in due casi e assai abbondante.

*Casi di marasma pellagroso.*

Il reperto anatomo-patologico che riguarda dei casi di marasma pellagroso morti nell'autunno e nell'inverno 1901 si può riassumere nel modo seguente: Meningi in qualche caso con un lieve ispessimento diffuso; frequenti

i fenomeni di bronco-pneumonite terminale; cuore con degenerazione grassa; atrofia accentuata delle pareti intestinali ed enterite cronica diffusa.

In due casi si ebbero inoltre aderenze pleuriche di antica data e in tre casi invece pleurite e peritonite tubercolare. Alla pleura il processo tubercolare era meno avanzato che al peritoneo. I bacilli di Koch più facilmente dimostrabili nel peritoneo, che nella pleura. Nel cavo pleurico in tutti e tre i casi esisteva abbondante versamento emorragico. Nulla di notevole negli altri organi.

Reperto batteriologico: In 4 casi su 8 si ebbe reperto negativo. In un caso di un vecchio di 70 anni, morto nell'Aprile 1901, si isolò l'*aspergillus fumigatus* dal parenchima polmonare e dalla milza. Il parassita era assai scarso tanto nel polmone quanto nella milza. Le seminagioni fatte dagli altri organi rimasero sterili.

Negli altri tre casi, morti rispettivamente nei mesi di Luglio, Settembre e Novembre 1901, e con fatti di pleurite e peritonite tubercolare, si isolò abbondante e in colture pure l'*aspergillus fumigatus* dalle pleure, presentanti la lesione suddetta. Il parassita si isolò costantemente, tanto seminando le raschiature delle pleure, quanto seminando il versamento emorragico del cavo pleurico.

In nessuno di questi tre casi si è potuto isolare però il parassita dal cavo peritoneale, per quanto le seminagioni, fatte con raschiamenti delle parti, fossero state sempre abbondanti.

Così pure il parassita in tutti questi casi non si potè isolare da nessun altro organo, compreso l' intestino.

*Casi di diagnosi dubbia.*

Trattasi di tre contadini, provenienti da regioni infette da pellagra, i quali morirono nel Maggio 1901, pochi giorni dopo la loro entrata nell' Istituto, con fenomeni di una forma acuta clinicamente affine al tifo pellagroso e al delirio acuto.

La diagnosi però rimase dubbia, giacchè, mentre esistevano i gravi fenomeni psichici e motorî, questi non avevano però nulla di caratteristico che potesse permettere di attribuirli piuttosto all' una che all' altra delle due forme suddette di frenosi acuta. Mancavano infatti lo stato di contrattura tetanica e le violente scosse muscolari per la diagnosi di una forma di pellagra acuta; come pure mancavano le allucinazioni terrifiche

e quel grave stato di agitazione e confusione mentale per la diagnosi di delirio acuto. Nulla di notevole avea rilevato l' esame delle urine, come pure l' esame batteriologico del sangue fatto con i mezzi comuni.

Al tavolo anatomico non si riscontrò che uno stato di intensa congestione di tutti gli organi interni. L'intestino e i polmoni però presentavano il massimo grado di questa congestione, come si ha appunto nel tifo pellagroso.

Fatte delle seminagioni abbondanti nel liquido di Raulin coi varii organi di questi tre casi, si isolò, sebbene, non in grande abbondanza, dai polmoni, dal fegato e dalla milza l' *aspergillus fumigatus* in coltura pura in due casi; mentre nell'altro caso il parassita isolato dal polmone era misto all'*aspergillus niger*. Il reperto delle pleure e delle meningi in questi casi fu completamente negativo e su questo fatto richiamo l'attenzione in modo particolare, potendo forse avere qualche importanza nel quadro clinico speciale presentato dagli infermi.

Reperto microscopico : Le ricerche istologiche furono fatte per ora a preferenza sulle pleure, quali parti dell' organismo dei pellagrosi nelle quali il riscontro dei parassiti fu più costante e le lesioni macroscopiche furono più manifeste e caratteristiche. In qualche caso però fu esaminato anche il tessuto polmonare, specialmente di quei punti che macroscopicamente sembrava presentassero qualche cosa di notevole. Così fu esaminato il polmone di un caso di pleuro-pericardite acuta, avente in corrispondenza della lesione pleurica una fortissima congestione polmonare, e in un caso di tifo pellagroso nel quale la congestione polmonare diffusa era assai accentuata ed era accompagnata da abbondanti focolai emorragici. L'esame del polmone fu fatto inoltre in un caso di forma sub-acuta e che al tavolo anatomico avea presentato una pleurite adesiva cronica riacutizzata con dei piccoli focolai di pneumonite corticale cronica.

Nei primi due casi null' altro si riscontrò anche all' esame istologico che una grave congestione polmonare, con delle piccole infiltrazioni emorragiche qua e là, specialmente nel caso di tifo pellagroso. Nel caso di pleurite adesiva riacutizzata, e avente dei noduli di pneumonite corticale, l' esame microscopico ha messo in evidenza le lesioni caratteristiche d' una pneumonite corticale cronica interlobulare d' origine pleurica.

I piccoli noduli che risultavano alla palpazione erano in massima parte rappresentati da tessuto fibroso sclerosato, disposto ad anelli concentrici e disseminati, da pigmento nerastro di antracosi. In molti di questi noduli non esistono traccie di parenchima polmonare. In altri, invece, e precisamente in quelli in cui il tessuto fibroso non ha ancora assunto l' aspetto sclerotico avanzato, si osserva nella loro parte centrale del tessuto polmonare alveolare compresso e condensato, spesso misto a elementi neoformati di tessuto connettivale. In questi noduli di data più recente non è raro il riscontro anche di bronchioli. Questi sono sempre deformati, e avviluppati da tessuto fibroso compatto; mentre il loro epitelio appare ancora ben conservato. In queste granulazioni manca la presenza di cellule giganti e di masse caseose.

Il tessuto sclerotico polmonare appare poi infine in diretto rapporto etiologico col tessuto fibroso e inspessito dei setti interlobulari della pleura, che sono spesso infiltrati anche da cellule embrionali. Nelle regioni corticali del polmone è assai evidente la genesi pleurogena di queste granulazioni, che risultano formate quasi esclusivamente da zaffi di tessuto pleurico inspessito, che si sono spinti nel polmone, avvolgendo porzioni di tessuto alveolare.

La pleura poi di questo caso in alcuni punti appare soltanto inspessita e compatta, coi segni caratteristici d' una lesione di antica data. In altri punti invece appare costituita, specialmente sulla superficie libera, da pseudo membrane neoformate, fatte da un reticolo fibrinoso infiltrato da ammassi di cellule connettivali embrionali e da leucociti. In queste membrane di recente formazione abbondano le lacune e i capillari ripieni di sangue.

A un dipresso cogli stessi caratteri qui trascritti si presentarono pure le lesioni del pericardio nelle forme di pericardite fibrinosa acuta e sub-acuta riscontrate nei nostri pellagrosi e dalle quali s'era isolato abbondante, come dalla pleura, ora l' *aspergillus fumigatus*, ora l' *aspergillus flavescens*.

Delle lesioni a forma di granulazioni tubercolari non furono mai rinvenute nè sulla pleura, nè sul pericardio, anche all' esame microscopico; ma si ebbe sempre a che fare con un processo flogistico diffuso. La ricerca dei parassiti nel parenchima polmonare, nella pleura e nel pericardio fu fatta ripetu-

tamente in parecchi casi, ricorrendo specialmente alla tionina all'acido fenico, che ci sembrò fornire il mezzo di colorazione più opportuno per mettere in evidenza nei tessuti i funghi che si erano isolati per mezzo delle seminagioni fatte nei mezzi di coltura con frammenti, o meglio ancora coi prodotti di raschiatura delle parti lese.

Nel parenchima polmonare non fu mai possibile il riscontro del parassita all' esame diretto, sia nei casi con semplice congestione, sia nei casi con carattere di pneumonite corticale. Soltanto qualche rara volta ci è sembrato di scorgere, in corrispondenza della zona corticale del polmone, alcune forme irregolari, oblunghe, le quali avevano l' aspetto di frammenti di miceli aspergillari. Forme complete, che permettessero la diagnosi sicura del parassita, però, non furono mai riscontrate.

Anche nelle pleure e nel pericardio, nei punti che avevano presentate lesioni macro- e microscopiche evidentissime e che all' esame colturale avevano dato luogo ad abbondantissime vegetazioni aspergillari, la ricerca diretta del germe difficilmente diede dei reperti positivi. La spiegazione di questo fatto apparirà in parte, come mostrerò a suo tempo, da alcune mie ricerche, rivolte a determinare sperimentalmente la pleurite e la pericardite aspergillare in alcune specie d'animali, specialmente nei cani, nei quali appunto il germe scompare rapidamente dal punto d' iniezione, pure lasciando profondamente alterato pleura e pericardio. La ragione principale, però, dei reperti negativi è dovuta, come vedremo più avanti parlando di altre ricerche sperimentali, al fatto che il parassita in questi tessuti si conserva preferibilmente allo stato di spora.

Intanto per ora mi limito all' esposizione di alcuni fatti più importanti che riguardano queste mie ricerche preliminari fatte sulla pleura dei pellagrosi.

Nella pleura avente i caratteri in genere d' una lesione di antica data non fu mai possibile riscontrare delle forme parassitarie, nè che avessero qualche rassomiglianza coi miceli degli aspergilli, nè con altri germi. Solo nelle pseudomembrane di data recente, in mezzo alle cellule embrionali e ai leucociti, in qualche caso ci fu possibile osservare delle forme oblunghe e corte, che per la loro forma e struttura potrebbero in modo più chiaro che nel tessuto polmonare, essere diagnosticate

quali frammenti di micelî aspergillari. Questi micelî corti, o questi frammenti di micelî, si trovano isolati e disseminati nel tessuto in modo affatto irregolare. É impossibile poi diagnosticare da questi frammenti di micelî se si tratta dell' *aspergillus fumigatus* oppure del *flavescens*. In nessun caso, anche in quelli in cui le pseudo-membrane che, per l' abbondante infiltrazione di cellule embrionali e di leucociti, apparivano di data recentissima, fu possibile dimostrare, tra le maglie del tessuto fibrinoso, delle forme complete, dei filamenti di micelî lunghi e ramificati.

Per agevolare il riscontro dei parassiti nella compagine dei tessuti, ultimamente in un caso di pleurite specifica sub-acuta con forte congestione polmonare ricorsi all' espediente di lasciare i pezzi anatomici, prima di passarli nei liquidi fissatori, qualche ora nella stufa, a 38°, immergendoli nel liquido Raulin, onde produrre artificialmente nei tessuti un aumento di sviluppo degli stessi parassiti.

Questo espediente, al quale, come vedremo più avanti, noi dobbiamo di avere potuto constatare e studiare nei suoi particolari la presenza dei germi anche in quei pezzi anatomici sui quali prima l' esame microscopico diretto era sempre stato negativo, servì infatti a mettere in evidenza, sia nel tessuto polmonare congesto sottostante alla pleura, sia nella pleura stessa inspessita per la formazione di pseudo-membrane, la forma di micelî abbastanza lunghi e ramificati anche nei pezzi anatomici che erano stati solamente 8 ore alla stufa. Ma sull' utilità di questo metodo di ricerca diremo più a lungo nella seconda parte del lavoro, studiando la questione dal punto di vista sperimentale.

L' *aspergillus fumigatus*, l' *aspergillus flavescens* furono quindi gli agenti patogeni isolati quasi costantemente e quasi sempre in colture pure, sia dal parenchima polmonare in uno stato di speciale congestione, sia dalle pleure, pericardio e pia meninge che presentavano i caratteri di un processo flogistico a carattere diffuso, acuto o sub-acuto, nei cadaveri di pellagrosi.

Che questi parassiti debbano poi rappresentare la causa diretta delle lesioni suddette non è possibile negarlo data la costanza della loro presenza. Il fatto che non si trovano quasi mai nel sangue e in nessuna altra parte dell' organismo,

neppure nel contenuto intestinale, escluderebbe la possibilità di una invasione dall'intestino stesso, avvenuta dopo la morte o nel periodo agonico. Vedremo poi più avanti come anche sperimentalmente si possano riprodurre le lesioni suddette cogli aspergilli in discorso; per cui noi dovremo fin d'ora ammettere che negli individui che muoiono per pellagra esista quasi costantemente un processo pneumonico acuto, e più spesso ancora una pleurite, complicata spesso con una pericardite e con una meningite di origine aspergillare, determinata ora dall' *aspergillus fumigatus*, ora dall' *aspergillus flavescens*, che solo in qualche raro caso possono unirsi per dar luogo a un' infezione mista.

Anche l' *aspergillus niger* fu riscontrato in due casi unitamente all' *aspergillus fumigatus*, ma quello era in proporzioni così minime in confronto a quest' ultimo, che io mi limito in questo lavoro a trattare dei due aspergilli più frequenti fin qui riscontrati, cioè degli aspergilli *fumigatus* e *flavescens;* riservandomi uno studio più completo anche sull' *aspergillus niger*, quando un maggior numero di casi ci autorizzasse a dargli un' importanza etiologica in queste infezioni.

Per ciò che riguarda i reperti delle ricerche parassitarie sui cadaveri dei pellagrosi, voglio qui ancora richiamare l' attenzione sulla frequenza con cui si localizzano i parassiti sulla pia meninge, specialmente nelle forme acute; giacchè mi sembra che questo fatto debba avere un' importanza non lieve nel determinare tutti quei fenomeni caratteristici appunto delle forme acute di pellagra, cioè: gravi disturbi psichici, ipereccitabilità, forte aumento del tono muscolare, sussulti tendinei, ecc.

Un altro punto che vorrei ancora mettere in rilievo è quello che riguarda il rapporto tra la specie dell' aspergillo che si riscontra nelle diverse stagioni dell' anno, sia negli individui morti di pellagra, sia sul *maiz* avariato e sulla polenta lasciata ad ammuffire; siccome però su questo argomento dovrò ritornare più avanti, quando dimostrerò che l'infezione aspergillare su descritta è la causa di morte dei pellagrosi, così mi accontento di aver qui accennato a tale rapporto, che dimostra l' importanza che può avere il *maiz* nel determinare l' infezione aspergillare.

## Cap. V. — *Isolamento dei germi dai polli morti in seguito a nutrizione con maiz avariato. Lesioni macro- e microscopiche.*

I polli che servirono per queste ricerche sono quelli, come già dissi in principio di questo mio lavoro, che nel Luglio 1899 sottoposi alla nutrizione di *maiz* avariato pei miei studi sull'ereditarietà nella pellagra sperimentale. Questi furono 16 e suddivisi in due gruppi composti ciascuno di un gallo e sette galline. Nell' anno susseguente, per ragioni speciali di studio, uno dei pollai fu eliminato e ad esso si sostituì un secondo gruppo di polli composto di un gallo e tre galline nati, come vedremo a suo tempo, dal primo pollaio tuttora esistente. Orbene, nel periodo di tempo decorso dal Luglio 1899 al Marzo 1902, dei suddetti polli alimentati costantemente con *maiz* avariato, due soli, una gallina e un gallo, morirono di morte naturale. La gallina morì, alla fine dell' Agosto 1900, dopo circa un anno da che era in osservazione. Durante la primavera avea avuto assai accentuati i fenomeni d' intossicamento maidico (forte eritema cutaneo, ecc.) sotto forma acuta; ma, rimessasi alquanto, entrò in seguito in uno stato di cachessia assai manifesto, che durò fino al momento della morte, senza mai presentare dei fenomeni degni di nota.

L' autopsia di questa gallina fu già da me riassunta nella prima mia nota sull' ereditarietà nella pellagra sperimentale. Nessun fatto notevole era stato osservato negli organi interni, tranne un' accentuata iperemia dell' intestino, specialmente del tenue.

Le seminagioni fatte in brodo comune dal sangue e dagli organi interni, rimasero tutte sterili. Le seminagioni fatte in liquido Raulin rimasero pure sterili, tranne quelle del contenuto intestinale che diedero luogo a sviluppo abbondante di ifomiceti, tra i quali però predominavano in modo notevole l' *aspergillus fumigatus* e l' *aspergillus flavescens*.

Il gallo morì invece alla fine dell' Aprile 1901, vale a dire due anni dopo da che era stato sottoposto alla nutrizione di *maiz* guasto. Già circa un mese prima l' animale avea perduto il suo aspetto vivace normale e accennava ad un lento e progressivo deperimento, con perdita enorme delle piume e

colla comparsa anche dell' eritema cutaneo secco nelle parti denudate. Il suo stato generale era però sempre ancora soddisfacente; quando, sei giorni prima della morte, s' aggravò d' improvviso, rifiutando da allora il cibo. L' animale, colla cresta cianotica e con le penne arruffate, rimaneva dapprima accovacciato e aveva anche frequenti scariche diarroiche. In seguito comparvero i fenomeni di una paresi spastica alle gambe, e in fine, nelle ultime 20 ore circa, comparvero delle scosse muscolari diffuse a tutto il corpo, ma più spiccatamente al collo e alle gambe. L' animale morì in uno stato di rigidità muscolare caratteristica; pesava 750 gr., mentre tre mesi prima ne pesava 1460. La cute era di color giallo terreo con chiazze di color rosso-paonazzo intenso, le carni pallide e gialliccie.

All' autopsia le meningi e la massa cerebrale erano congeste, come pure tutti gli altri organi interni. Il polmone e l' intestino però erano quelli che presentavano il massimo grado di congestione. Le anse intestinali erano floscie, non distese da gas, ma contenenti del liquido siero-mucoso e sanguinolento. Le pareti intestinali apparivano alquanto atrofiche, e la mucosa tumefatta e ricoperta da chiazze emorragiche.

Si fecero colture numerose da tutti gli organi interni e dal contenuto intestinale, sia in brodo comune, sia in liquido di Raulin. Tutte le colture fatte in brodo rimasero sterili, tranne quelle dell' intestino, nelle quali però non si riscontrò alcun germe degno di attenzione. Le colture fatte nel liquido di Raulin rimasero pure tutte sterili, tranne quelle dal polmone e dal contenuto intestinale, che diedero luogo allo sviluppo di *aspergillus fumigatus*. Dall' intestino lo sviluppo dell' ifomiceta fu abbondantissimo e quasi sempre in coltura pura. Dal polmone lo sviluppo dell' ifomiceta fu assai meno abbondante, essendosi ottenuto solo in due tubi sopra otto che erano stati seminati. Del polmone e dell' intestino furono conservati dei pezzi per l' esame microscopico.

L' esame microscopico del polmone non potè che confermare un forte stato di congestione dell' organo. L' esame dell' intestino invece mise in più chiara evidenza interessanti particolari dell' enterite catarrale subacuta riscontrata all' autopsia. Le pareti intestinali anzitutto apparvero ovunque fortemente atrofiche, e ciò specialmente al tenue, ove presentavano uno

spessore ridotto a circa un terzo del normale. Le *Fig. 1* e *2* della *Tavola*, che riproducono due sezioni trasversali fatte alla stessa altezza dell' intestino tenue, una appartenente a un pollo normale e l' altra al pollo in esame, ci dànno un' idea abbastanza chiara del grado di atrofia, la quale, come vedesi dalle figure stesse, risulta sia a danno dello strato mucoso, sia a danno degli strati profondi.

I villi intestinali anzitutto appaiono più scarsi e assai più corti della norma. Sono tozzi, informi, tronchi e necrosati alle loro estremità libere. In molti punti l' epitelio cilindrico che li riveste manca affatto, e dove esiste è fortemente alterato, in preda a uno sfaldamento e a una necrosi molto accentuata. In qualche punto, poi, negli strati più profondi, l'epitelio ha perso spesso la sua forma tipica e appare in uno stato di attivissima rigenerazione con un numero esagerato di forme cariocinetiche. Questi ultimi caratteri della lesione si riscontrano in particolar modo nelle ghiandole di Lieberkühn, le quali di solito hanno perso la loro forma tipica tubulare e si presentano deformate in vario modo.

Il tessuto di sostegno dei villi appare fortemente inspessito da cellule embrionali e più ancora da infiltrazione leucocitaria, la quale abbonda anche nel tessuto sottomucoso. La *muscolaris mucosae* e la tonaca muscolare profonda sono fortemente atrofiche. Le fibre muscolari appaiono diminuite di numero, e il loro volume è assai ridotto. Molte di queste non assumono neppure la colorazione dei carminii, appaiono sbiadite, piene di piccoli vacuoli e prive di nuclei. La sierosa invece appare lievemente inspessita e presenta un aumento dei nuclei.

Abbondanti focolai emorragici di data antica e recente si riscontrano nei diversi strati delle pareti intestinali e specialmente in corrispondenza dello strato sotto mucoso. Vegganasi le *fig. 3* e *4*.

Sezioni del polmone e dell' intestino furono colorate colla tionina fenica per la ricerca dei parassiti nel tessuto; ma in nessun caso fu possibile mettere in evidenza delle forme filamentose, dei micelî o frammenti dei medesimi, dei quali si potesse fare una diagnosi sicura. Solo negli strati delle pareti intestinali, specialmente nello strato sottomucoso, si poterono osservare dei piccoli elementi, spesso disposti a piccoli gruppi, che per la loro forma tondeggiante, pel loro diametro e per

la loro proprietà di colorarsi intensamente colla tionina, potevano essere considerate come spore dell' *aspergillus fumigatus*.

È inutile che io mi fermi oltre sul reperto batteriologico che abbiamo ottenuto all' autopsia di questi due polli, morti con tutti i fenomeni di un intossicamento maidico, per dimostrare ancora una volta l' importanza che debbono avere gli aspergilli nella pellagra; giacchè questo risulta troppo evidente dal complesso dei fatti sopra ricordati.

La natura del germe, la localizzazione del medesimo e il carattere delle lesioni macro- e microscopiche riscontrate in questi due polli e che riproducono in gran parte i reperti già sopra descritti dei cadaveri di pellagrosi, provano nel modo più eloquente che la causa di morte sia dei pellagrosi, sia dei polli sopra descritti, debba essere stata la medesima.

Siccome però il reperto batteriologico dell' intestino potrebbe nei nostri due polli avere anche un' importanza secondaria, e in uno solo di questi due casi, cioè nel secondo, noi possiamo con sicurezza ammettere che la morte sia stata determinata da un processo infettivo che avea colpito, oltre l' intestino, anche l' apparato respiratorio, così io credo che intanto il migliore contributo alla patogenesi della pellagra offerto dalle due autopsie suddette, sia dato dalle lesioni intestinali sopra descritte.

Basterà infatti ricordare i caratteri dell' enterite catarrale dei pellagrosi descritta dal Vassale (18) contraddistinta da notevole atrofia dagli strati muscolari, per convincersi dell' analogia che esiste tra le lesioni intestinali dei pellagrosi e quelle che si hanno nei polli nutriti a lungo con *maiz* avariato.

A ogni modo, dovendo più tardi ritornare su questo argomento, senza oltre dilungarmi sulla spiegazione dei reperti, mi basti di aver qui richiamata su di essi l' attenzione per dimostrare la grande analogia tra la pellagra e i fenomeni d' intossicamento maidico nei gallinacei.

---

## PARTE II.ª

### Cap. I. — *Coltivazione dei parassiti sul maiz e loro proprietà patogene in rapporto al maiz stesso.*

Tanto coll' *aspergillus fumigatus*, quanto coll'*aspergillus flavescens*, isolati in colture pure dai cadaveri dei pellagrosi, ho infettato del *maiz* sano e sterilizzato. Sul grano sterilizzato a secco però non fu mai possibile ottenere la vegetazione dei funghi, anche lasciando per dei mesi interi le seminagioni alla stufa a 38°-39°.

La vegetazione invece fu sempre rapida e rigogliosa quando il grano era stato sterilizzato al vapore acqueo, specialmente poi se la sterilizzazione era stata preceduta da una lieve umettazione del grano stesso, fatta con acqua.

Il grano distribuito a sottili strati in grosse bottiglie di Erlenmeyer, umettato e sterilizzato all' autoclave, se viene seminato coi suddetti ifomiceti, dopo 24 ore che è nella stufa è già ricoperto da una densa patina biancastra, che va rapidamente assumendo nel breve periodo di poche ore il colore caratteristico dei due funghi.

Se però i funghi si seminano su grano che fu solamente sterilizzato all' autoclave, senza previa umettazione, la loro vegetazione avviene più lenta ed è assai meno diffusa. Di solito in questo caso la vegetazione si limita quasi esclusivamente all' ilo delle cariossidi, in corrispondenza del quale, dopo 3-4 giorni di incubazione, appare una macchia puntiforme del colore dell' ifomiceta stesso.

L' *aspergillus flavescens* tuttavia se viene lasciato nella stufa più a lungo, pel suo rigoglioso sviluppo si diffonde presto avvolgendo tutta la superficie del grano; mentre l' *aspergillus fumigatus* rimane limitato all' ilo della cariosside se anche viene lasciato per più giorni nella stufa. Anche quest' ultimo però col tempo si diffonde e avvolge anche nel suo sviluppo tutta la superficie della cariosside.

Per le mie esperienze, che saranno descritte tra poco, rivolte a determinare il potere patogeno dei parassiti in rapporto al *maiz* su cui vennero coltivati, mi sono servito come

tipo costante di *maiz* avariato, di quel grano che era stato sterilizzato all'autoclave senza altra manipolazione, ed era stato in seguito infettato e lasciato alla stufa non più di 3-4 giorni; di modo che le cariossidi di solito conservavano nel loro insieme un aspetto pressochè normale, limitandosi, come già dissi, lo sviluppo dell' ifomiceta al solo ilo.

Gli animali d' esperimento furono numerosi e di diverse specie: una scimmia, cani, conigli, cavie, polli e piccioni.

Le ricerche furono poi divise in due ordini: quelle dirette a determinare il potere patogeno dei parassiti in rapporto al *maiz* su cui si erano sviluppati, e quelle rivolte a determinare il potere patogeno degli stessi parassiti indipendentemente dal *maiz*.

Per la prima serie di esperienze ho ricorso, per ora, all'inoculazione intraperitoneale delle stesse cariossidi nelle quali il fungo si era sviluppato. Per la seconda serie di esperienze, che doveva servire come di controllo alle prime, ho invece ricorso all' inoculazione intraperitoneale di semplici emulsioni degli ifomiceti, ripetendo presso a poco quello che fecero quasi tutti gli autori che studiarono finora l' aspergillosi sperimentale.

*Aspergillus fumigatus.* — Per le cavie e pei conigli giovani, del peso di 400 gr. le prime e di 1500 gr. i secondi, bastano due o tre cariossidi avariate di recente con *aspergillus fumigatus* (il fungo sempre limitato all' ilo della cariosside) e inoculate nel peritoneo per ottenere la morte degli animali in modo quasi fulmineo, vale a dire nel periodo di 8-10 ore circa.

Nelle cavie adulte del peso di 700 gr., collo stesso numero di cariossidi inoculate nel peritoneo la morte avviene dopo 15-20 ore; mentre i conigli adulti del peso di 2000 gr., trattati nella stessa maniera, muoiono dopo 24-34 ore.

Di solito gli animali poco tempo dopo l'innesto si presentano irrequieti, spesso guaiscono, quindi entrano rapidamente in un vero stato comatoso.

Quando la morte non è fulminea, cioè nei casi nei quali la morte avviene almeno dopo le prime 24 ore circa, questa è inoltre preceduta da scariche diarroiche molto intense e spesse volte anche da uno stato spastico generale di tutti i muscoli del corpo, che diventano oltremodo rigidi. Sebbene

di raro, in questi animali dai fenomeni acutissimi si possono anche osservare dei brevi sussulti muscolari, ora diffusi a tutto il corpo, ora limitati a un gruppo di muscoli. In tutti questi casi all' autopsia si ha congestione generale di tutti gli organi interni, la quale può essere intensissima se la morte avviene non prima delle 24 ore.

La congestione è sempre di massimo grado all' intestino, e in modo speciale in corrispondenza delle anse che sono state in diretto contatto colle cariossidi avariate. In queste località le anse intestinali presentano un color rosso vermiglio intenso, con delle emorragie puntiformi. Le cariossidi sono completamente libere fra le anse intestinali se la morte degli animali avviene nel periodo di 8-10 ore; mentre invece, se la morte avviene non prima delle 24 ore, le cariossidi sono avvolte da sottili pseudo-membrane costituite da fibrina e da leucociti che fissano le cariossidi stesse alle pareti intestinali. In questo ultimo caso, poi, nel cavo peritoneale generalmente si hanno pure poche goccie di essudato siero-sanguinolento; il contenuto intestinale è sempre liquido, spesso pure sanguinolento.

Coll' essudato peritoneale e dai vari organi interni di questi animali furono sempre fatte abbondanti seminagioni, tanto nel liquido Raulin, quanto nel brodo comune. Le prime seminagioni dimostrarono costantemente che il parassita inoculato colle cariossidi era sempre rimasto localizzato alle cariossidi stesse, non essendosi esso mai riscontrato in nessun organo e neppure nel cavo peritoneale. Le seconde seminagioni fatte con brodo peptonizzato, dimostrarono invece la costante presenza in questi casi di un'autoinfezione setticoemica, di solito di natura mista, e costituita da stafilococchi, da streptococchi, dal *bacterium coli*, ecc., determinata certamente da un rapido passaggio nel peritoneo e nel circolo di germi che abitualmente vivono nell' intestino.

Inutile dire che le autopsie furono fatte subito dopo la morte degli animali, per dimostrare che questo passaggio dei germi traverso le pareti intestinali, determinato certo dalle profonde lesioni locali prodotte dall' azione tossica dell' *aspergillus fumigatus*, costituisce un fenomeno costante avvenuto non dopo la morte, ma durante la vita degli animali. A conferma di questo stanno anche i risultati egualmente positivi che ottenni in alcune cavie e conigli sacrificati poche ore

dopo l'inoculazione, quando cominciavano a presentare le prime scariche diarroiche.

In questi animali sacrificati, però, come in quelli morti di forma acutissima, nel periodo di 8-10 ore, i germi comuni si riscontrarono di sòlito nel cavo peritoneale, e solo qualche volta furono riscontrati anche in circolo; il che spiegherebbe in certo qual modo anche il meccanismo delle auto-infezioni stesse, che, in questi casi almeno, avverrebbero pel passaggio prima di germi dall'intestino al cavo peritoneale, e poi da questo nel circolo sanguigno.

La mancanza dei germi comuni nel circolo di questi animali dimostrerebbe poi come la loro morte sia realmente dovuta all'azione tossica dell'ifomiceta introdotto nel cavo peritoneale col *maiz* su cui aveva vegetato.

Sarebbe bastato il fatto che nessuno degli autori che si interessarono del potere patogeno dell'*aspergillus fumigatus* prima degli attuali miei risultati, per quel che io mi sappia, potè mai ottenere nè la morte degli animali così fulminea, nè il fenomeno delle auto-infezioni d'origine intestinale, inoculando, sia per la via del peritoneo, sia per la via sanguigna, l'ifomiceta puro o in emulsioni, anche a dosi rilevanti, per dimostrare che il potere patogeno dell'*aspergillus fumigatus* viene a subire un notevole aumento qualora questo parassita possa entrare nell'organismo animale unitamente al *maïz* che gli aveva servito prima come terreno di coltura.

Ad ogni modo ho voluto ripetere, come già dissi, le esperienze degli autori, cioè, di Grohe (7), Lucet (8), Rénon (9) e Obici (4), che, inoculando l'ifomiceta per la via peritoneale, ottennero la morte di cavie e di conigli solo dopo 12-24 e più giorni, ricorrendo anche a dosi rilevanti. Ho inoculato emulsioni di spore di *aspergillus fumigatus* in proporzione da 5 sino a 10 e più volte superiori a quelle quantità di spore che si possono trovare sopra 2-3 cariossidi lievemente avariate nel modò suddetto. Orbene, anche in questi casi la morte non fu mai fulminea, ma avvenne sempre parecchi giorni dopo, negli animali adulti, cioè dopo 10-20 e più giorni. Solo negli animali giovani la morte avvenne in un periodo più breve, oscillante tuttavia sempre tra i 5 e i 10 giorni. In nessun caso inoltre l'infezione aspergillare potè determinare il passaggio dei germi

comuni dell' intestino nel peritoneo e tanto meno nel circolo sanguigno.

Per maggior garanzia ho voluto ancora provare il potere patogeno del parassita puro, spoglio del *maiz*, inoculandolo direttamente nelle vene, ripetendo così le esperienze di Dieulafoy, di Chantemesse et Vidal (10), di Lucet (11), di Gaucher et Sergent (12), di Rénon (13) e di Obici (4), che ricorsero appunto a emulsioni di spore assai concentrate. Come è avvenuto ai citati autori, però, anche con questo metodo gli animali non presentarono mai i fenomeni acuti che si osservarono inoculando le cariossidi avariate. Occorsero di solito in questo caso emulsioni fatte con una quantità di spore circa 4-5 volte superiore a quelle che possono trovarsi sopra 2-3 cariossidi lievemente avariate, per ottenere la morte di cavie e conigli adulti in 3-9 giorni. Il fenomeno delle auto-infezioni di origine intestinale non si è mai osservato neppure in questi animali.

Le emulsioni adoperate poi furono fatte, ora con spore ottenute da colture dell' ifomiceta sopra patate, ora invece con spore ottenute mediante la triturazione e lavaggio delle stesse cariossidi fatte avariare molto intensamente.

I risultati delle iniezioni intra-peritoneali e intra-venose fatte con emulsioni di spore provenienti, sia da patate, sia dal *maiz* stesso, furono sempre a un dipresso eguali; il che ci dimostra chiaramente che il potere patogeno del germe aumenta soltanto a cominciare dal momento in cui esso entra nell' organismo animale unitamente al *maiz* su cui si era sviluppato.

Se questo aumento del potere patogeno sia dovuto ad una esaltazione della virulenza del germe, come parrebbe, determinata dal *maiz* stesso su cui vive, oppure se sia dovuto a qualche altra ragione, lo vedremo più avanti.

L' intensità e la natura delle lesioni e dei fenomeni clinici possono tuttavia variare anche inoculando le cariossidi infette di *aspergillus fumigatus*, specialmente ricorrendo a quantità minime, in modo da ottenere la morte degli animali con forme sub-acute e croniche.

Inoculando infatti due cariossidi, sempre lievemente avariate, nella maniera e nel grado già descritte, nel peritoneo di conigli adulti e del peso di gr. 2400 circa, nel giugno 1901 ottenni la morte degli animali nel periodo di 7-10 giorni.

La morte avvenne nei conigli dello stesso peso dopo 20-30 giorni inoculando una sola cariosside.

Ora le esperienze furono ripetute parecchie volte, ma in nessun caso si ebbe a constatare anzitutto la complicazione delle auto-infezioni di origine intestinale.

In questi casi di morte sub-acuta o cronica si ebbero però a constatare assai di sovente degli altri fenomeni caratteristici che meritano sempre la nostra attenzione, sia perchè anche questi non si possono ottenere col germe solo, inoculandolo in emulsioni in qualsiasi dose e in qualsiasi modo, sia perchè riproducono, in grande parte almeno, il quadro clinico della pellagra nell' uomo.

I conigli inoculati con una o due cariossidi avariate vanno incontro a un rapido deperimento generale, in modo che quelli che sopravvivono oltre i 15-20 giorni possono perdere la metà e più del loro peso.

Gli animali qualche giorno dopo l' inoculazione diventano sitofobi e sono presi da scariche diarroiche intense, che possono anche essere sanguinolente. Quello che è più caratteristico in questi animali poi, si è che entrano presto in uno stato di sovraeccitabilità, di maniera che reagiscono esageratamente a qualsiasi stimolo esterno. In seguito poi si osserva in essi un vero aumento del tono muscolare, che ha sempre un carattere progressivo; fino a che negli ultimi 2-3 giorni di vita compaiono dei veri fenomeni tetaniformi, caratterizzati specialmente da una paralisi spastica degli arti, prima dei posteriori, e poi degli anteriori, e da sussulti muscolari simili a quelli che si osservano nei casi di pellagra acuta. Questi sussulti in principio sono lievi, quasi fibrillari e localizzati di solito a un gruppo di muscoli che sono generalmente quelli del muso o del collo, oppure di un arto intiero, oppure di una parte sola dell' arto. Diventando poi questi fenomeni sempre più intensi, si diffondono a tutti i muscoli del corpo, fino a che l' animale muore di solito in uno stato di contrazione spastica generale.

Le contrazioni tetaniformi e i sussulti muscolari si possono facilmente determinare nei periodi di pausa, toccando solo lievemente l' animale o scuotendo la gabbia in cui questo si trova. La temperatura nelle cavie e nei conigli inoculati nei primi periodi solo in qualche caso presenta un lieve aumento. Costantemente, invece, un giorno o due dopo l' inoculazione

nell' animale, si nota un notevole grado di ipotermia, la quale è progressiva e intensa negli ultimi giorni di vita. L' ipotermia è costante anche nelle forme acute che abbiamo descritto più sopra.

Non in tutti gli animali è però costante e completo il quadro classico dei fenomeni su descritti. Nelle cavie, p. es., assai difficilmente si possono controllare le proprietà convulsivanti del tossico elaborato dall' ifomiceta. Esse muoiono di solito dopo poche scosse muscolari in uno stato di paralisi spastica generale.

Nei conigli invece i fenomeni sono più completi e caratteristici, ma anche in questi possono variare, nella durata e nell' intensità, da animale a animale. Di solito sono i conigli che muoiono in forma sub-acuta nel periodo di 5-8 giorni, quelli che presentano i fenomeni più caratteristici; mentre quelli che muoiono in forma cronica, presentano dei fenomeni meno intensi e meno caratteristici.

All' autopsia di tutti questi animali, il fatto che impressiona maggiormente è l' intensa congestione di tutti gli organi interni. Le meningi, la massa cerebro-spinale, fegato, milza, reni, ecc., sono costantemente in uno stato di forte congestione, e nei polmoni non di raro, oltre lo stato di congestione, si osservano delle emorragie puntiformi, sottopleuriche. Nell' intestino però l' iperemia raggiunge il suo massimo grado, è quasi sempre sulle pareti intestinali si riscontrano dei focolai emorragici.

Le lesioni più gravi sono sempre in corrispondenza delle parti che sono in diretto contatto colle cariossidi. Queste parti si presentano spesso in uno stato di necrosi più o meno avanzata, di modo che le cariossidi, in qualche caso, facendosi strada attraverso le parti necrosate, sono passate nel lume intestinale. Di solito le cariossidi si riscontrano aderenti e incastrate tra le anse intestinali, avviluppate da densi strati di leucociti sotto forma di masse di aspetto caseoso, circondate da una pseudo-membrana fibrinosa. Le cariossidi, poi, qualunque sia il periodo di tempo che sono rimaste nel cavo peritoneale, presentano sempre una forma e un aspetto, almeno apparentemente, identico a quello che avevano al momento dell' inoculazione.

Così anche il fungo è sempre rappresentato da un piccolo punto nerastro, limitato all' ilo e ridotto a una massa poltigliosa, povera di spore e di micelî e priva assolutamente

di conidî; per modo che, invece di un aumento, appare evidente, specialmente nei casi in cui la cariosside rimane più a lungo nel cavo peritoneale, una distruzione del parassita, dovuta certamente all' abbondante fagocitosi da lui stesso determinata.

Le seminagioni fatte in questi casi, sia dall'essudato peritoneale, sia dai varî organi interni, nei mezzi comuni di coltura rimangono sempre sterili, se anche l' autopsia viene fatta subito dopo la morte degli animali.

Così rimangono pure sterili le seminagioni fatte nel liquido di Raulin dai varî organi e dallo stesso essudato peritoneale. L' aspergillo non si può riscontrare vivo che negli strati più profondi dei leucociti che circondano le cariossidi.

Tutti questi reperti ci dimostrano già quindi chiaramente che la morte degli animali è causata anche in questi casi soltanto dai prodotti ipertossici che l' ifomiceta ha campo di elaborare nell' organismo, forse a spese del *maiz*, senza il bisogno di una abbondante proliferazione e d' una consecutiva invasione dei diversi organi vitali. La proliferazione e l' invasione dei parassiti nei diversi organi vitali avvengono invece negli animali che muoiono in seguito a iniezione del fungo puro o in emulsioni semplici, eseguite per la via peritoneale o sanguigna, come appunto dimostrarono gli autori che fino ad oggi si occuparono di aspergillosi sperimentale, e come io stesso poi controllai in altri animali iniettati colle emulsioni.

Che il potere patogeno dell' *aspergillus fumigatus* possa subire un notevole aumento e che i prodotti tossici da esso elaborati possano assumere nello stesso tempo le proprietà paralizzanti e convulsivanti più accentuate, quando il parassita entra nell' organismo unitamente al *maiz*, lo dimostrano ancora le seguenti esperienze, eseguite sopra alcuni cani, sopra una scimmia e sopra piccioni e polli. Ecco in breve i risultati ottenuti nel Giugno 1901, colle inoculazioni di cariossidi avariate nei cani, che sono sempre stati considerati dagli autori quali animali refrattarî all' infezione aspergillare.

Un grosso cane adulto del peso di 20 Kg., muore in 56 ore in seguito all' inoculazione intraperitoneale di 8 cariossidi di *maiz* lievemente e di recente infettato.

Un secondo cane adulto del peso di 10 Kg., muore in 49 ore coll' inoculazione di 5 cariossidi.

Questi due animali muoiono presentando gli stessi sintomi e le stesse lesioni anatomo-patologiche che abbiamo già sopra descritte pei conigli morti di forma acuta. I due cani infatti poche ore dopo l' inoculazione sono assai abbattuti, rimangono accovacciati e presentano un aumento di temperatura di circa un grado. Il giorno dopo l' inoculazione l' abbattimento degli animali è aumentato. Essi hanno delle scariche diarroiche, sono sitofobi e ipotermici, ed emettono dei guaiti. Reagiscono in modo esagerato agli stimoli e presentano una rigidità notevole dei muscoli degli arti e della schiena. Gli animali entrano rapidamente in uno stato comatoso e muoiono senza alcun fenomeno tetaniforme.

All' autopsia si ha congestione degli organi interni e specialmente dell' intestino. Il passaggio dei germi comuni dall' intestino al cavo peritoneale si osserva in ambedue i casi; mentre il passaggio di questi germi nel circolo sanguigno si ha solo nel secondo caso. L' ifomiceta non si isola che dal punto più avariato della cariosside; mentre non lo si riscontra affatto negli organi dell' animale.

Un terzo cane di 6 Kg. muore in 9 giorni coll'inoculazione intraperitoneale di 4 cariossidi. Questo poi presenta, oltre alla diarrea intensa, un rapido dimagramento, accompagnato da aumento progressivo del tono muscolare e da uno stato accentuato di ipereccitabilità dei riflessi. L' animale ha fin dai primi giorni il tronco arcuato e una rigidità caratteristica di tutti gli arti; di modo che difficilmente può camminare e si trova nell' impossibilità di salire le scale. Negli ultimi due giorni di vita, poi, insieme a una grave ipotermia è comparsa una vera paralisi spastica di tutti gli arti con scosse tetaniformi e sussulti muscolari diffusi a tutto il corpo.

All' autopsia si ha il solito reperto, caratterizzato dalla forte congestione di tutti gli organi interni. Manca il passaggio dei germi comuni dall' intestino nel peritoneo e nel circolo sanguigno. L' ifomiceta anche in questo caso è rimasto localizzato al punto avariato delle cariossidi, le quali sono ora avvolte da un denso strato di leucociti, e aderenti alle anse intestinali.

Due cani di controllo furono in seguito inoculati nel peritoneo con emulsioni pure di spore di *aspergillus fumigatus*. Il primo, che pesava 11 Kg., ricevette un' emulsione densa di 10 cmc. fatta con triturazione e decantazione di 12 cariossidi

fortemente avariate; il secondo, che pesava 7 Kg., ricevette un' emulsione pure di 10 cc. fatta con triturazione e decantazione di 8 cariossidi fortemente avariate dal suddetto parassìta.

I due animali non presentarono mai disturbi degni di nota e, sacrificati dopo un mese, non lasciavano scorgere più traccie dell' ifomiceta nel loro organismo.

Una scimmia del peso di 4 Kg., muore in 10 giorni in seguito all' inoculazione intraperitoneale di 2 cariossidi lievemente avariate. L'animale al terzo giorno comincia a ricusare il cibo, dimostrandosi molto abbattuto. Rimane accovacciato costantemente in un angolo della gabbia, ha un aspetto assai sofferente ed emette frequenti gemiti. Presenta un'esagerazione accentuata dei riflessi in genere, e ha delle scariche diarroiche abbondanti. La temperatura è lievemente aumentata.

Queste condizioni durano, quasi invariate, fino alla sera del quinto giorno. Al sesto giorno la temperatura discende a 36°; la diarrea si fa imponente, e si nota inoltre una paralisi spastica degli arti posteriori. Quest'ultimo fenomeno però non è costante, ma appare e scompare a periodi di qualche minuto; di modo che l' animale può ancora a tratti camminare.

Lo stato di eccitabilità generale va sempre più aumentando, e ora basta toccare l'animale o scuotere la gabbia in cui si trova per avere delle scosse tetaniformi e dei sussulti muscolari intensi e diffusi a tutto il corpo.

All' ottavo giorno la paralisi spastica del treno posteriore è completa e costante. L' animale ha una forte ipotermia (34°-33°); emette dei gemiti acutissimi, interrotti spesso da trisma, e presenta frequenti sussulti muscolari, ora diffusi a tutto il corpo, ora limitati a gruppi di muscoli. Nelle feci diarroiche sono ora comparse traccie di sangue.

L' animale si mantiene in questo stato per circa due giorni, e muore il mattino della decima giornata in uno stato tetaniforme.

All' autopsia si ha una congestione intensa di tutti gli organi interni e null' altro di notevole. Le cariossidi sono aderenti alle anse intestinali e avvolte da un denso strato di sostanza caseosa. Manca l' infezione d' origine intestinale e l' ifomiceta non si può isolare che dalle cariossidi.

Ecco ora il risultato delle esperienze eseguite coll' inoculazione di *maiz* infetto di *aspergillus fumigatus*, nel peritoneo di piccioni e di polli.

I piccioni si presentarono assai sensibili all' inoculazione del *maiz* aspergillare. Un piccione adulto con una cariosside lievemente avariata morì dopo 7 giorni, e un piccione giovane pure con una cariosside morì dopo 4 giorni. Con due cariossidi la morte in un piccione adulto avvenne dopo 8 giorni, e in un giovane dopo 3.

Gli animali non ebbero fenomeni tetaniformi, e alla autopsia presentarono, al contrario di quello che si era riscontrato nei mammiferi, una peritonite pseudo-tubercolare diffusa, caratterizzata dalla presenza di granulazioni miliari che tappezzavano tutto il peritoneo viscerale e parietale. Le cariossidi erano ancora, si può dire, libere e ricoperte solo in parte da essudato fibrinoso. Il germe non era quindi rimasto localizzato alle cariossidi, ma si era diffuso nel peritoneo e aveva invaso anche il fegato, che apparve pure in qualche punto gremito di tubercoli. Si ebbe, in poche parole, lo stesso reperto che si ottiene nei conigli e nelle cavie iniettate nel peritoneo con emulsione di spore dell' ifomiceta.

Risultati pressochè identici furono quelli ottenuti sui polli, colla diversità che questi all' azione tossica del *maiz* aspergillare si presentarono ancor più resistenti che i piccioni. L' inoculazione di 2-3 cariossidi di *maiz* infettate di recente coll'aspergillo, è, si può dire, tollerata quasi impunemente da galline di 1400 gr. circa. Queste subiscono nei primi giorni un lieve dimagrimento, accompagnato da un po' di diarrea, ma poi si rimettono completamente.

Una gallina di 1500 gr., inoculata nel peritoneo con 7 cariossidi avariate, sofferse un rapido dimagramento accompagnato da diarrea intensa, che continuò per circa un mese; ma poi si rimise un poco e ora, dopo quattro mesi, vive ancora in buone condizioni. Un' altra gallina del peso di 1380 gr., inoculata con 12 cariossidi avariate di recente morì dopo 9 giorni, presentando dimagramento e diarrea intensa.

La morte è stata preceduta inoltre da sussulti muscolari e da contrazioni spastiche dei muscoli, specialmente delle gambe e del collo, che durarono circa 8 ore ininterrotte. Alla

autopsia si ebbe una peritonite con lesioni a forma tubercolare, come nei piccioni. Devo però far qui notare che i fenomeni spastici e i sussulti muscolari li osservai anche in un' altra gallina in seguito alla inoculazione di un' emulsione di spore aspergillari fatte in una coscia. L' ifomiceta si era localizzato alla articolazione della coscia, dando luogo alla distruzione completa della testa del femore.

La resistenza enorme dei gallinacei all' azione patogena del *maiz* aspergillare, potrebbe spiegare come i polli in genere resistano abbastanza bene anche alla nutrizione con *maiz* avariato in genere, se prolungata anche per anni, come sarebbe appunto nel caso di alcuni polli ch' io tengo in osservazione da 3 anni circa.

I risultati delle esperienze qui sopra esposte ci dimostrano quindi in modo evidente, che il *maiz* sterilizzato e infettato di *aspergillus fumigatus* ha proprietà patogene di gran lunga superiori a quelle che possiede normalmente questo ifomiceta qualora venga immesso isolatamente nell' organismo animale.

Il *maiz* infetto di *aspergillus fumigatus*, se immesso nell'organismo specialmente di mammiferi, ha proprietà paralizzanti e convulsivanti che l' ifomiceta per se stesso non possiede o possiede in grado insignificante.

Rimane ora anzitutto da stabilire se l'aumento del potere patogeno e le proprietà caratteristiche che possiede il *maiz* infetto di *aspergillus fumigatus* sieno fatti legati alle sostanze maidiche, o puramente a prodotti tossici speciali elaborati dal parassita, sia in seguito a un vero esaltamento della sua virulenza determinato dalla presenza del *maiz*, sia in seguito a qualche altra circostanza, determinata però sempre dalla presenza della cariosside.

Perciò ho inoculato nel peritoneo di alcuni conigli giovani e adulti delle cariossidi, sia di *maiz* sano e sterilizzato, sia di *maiz* infetto di *aspergillus fumigatus* e poi sterilizzato. Orbene, tanto del primo, quanto del secondo campione di *maiz* gli animali sopportarono sempre impunemente 20 e più cariossidi, senza manifestare il minimo inconveniente. Furono fatte allora altre esperienze per vedere quale influenza poteva avere la presenza del *maiz* nell' organismo animale sul decorso d' una peritonite aspergillare, qualora si fosse impedito

all' ifomiceta di venire in diretto contatto col *maiz* stesso. Per questo furono ad alcuni conigli inoculate sotto cute 3, 4, 5 cariossidi di *maiz* sano e sterile, e nello stesso tempo si fece loro un' iniezione intraperitoneale di una forte dose di emulsione concentrata di spore di *aspergillus fumigatus*. Gli animali morirono dopo 11-19 giorni, colle stesse lesioni e cogli stessi fenomeni che presentavano i conigli sottoposti alla sola iniezione intraperitoneale di emulsione di spore dell' ifomiceta; vale a dire morirono di peritonite con lesioni di carattere tubercolare. Gli stessi risultati si ebbero iniettando contemporaneamente nel cavo peritoneale un' emulsione di spore e di farina di *maiz* sterilizzato.

Queste esperienze dimostrano chiaramente che l' aumento del potere patogeno dell' aspergillo e la sua proprietà di elaborare prodotti neurotossici sono dovuti soltanto al fatto meccanico di essere il germe incorporato nella cariosside, e non alla contemporanea presenza nell' organismo dell' elemento maidico.

Su questa interessante questione ritornerò con una nota speciale, rivolta a dimostrare se gli elementi maidici sono in realtà dotati della proprietà di esaltare la virulenza dell' ifomiceta qualora tanto quelli, quanto questo si trovino nell' organismo animale; giacchè più avanti vedremo meglio come, nel caso della cariosside infetta, il concetto di una possibile esaltazione della virulenza del germe, nel vero senso della parola, non si possa sostenere in modo assoluto. Qui voglio ancora affermare che la proprietà di aumentare l' azione patogena dell'*aspergillus fumigatus* non è soltanto del *maiz*; ma, come già potei stabilire con alcune ricerche preliminari, può essere anche di altri cereali e di altri prodotti vegetali, qualora questi sieno messi artificialmente nelle condizioni opportune di diventare anzi per tutto terreni di coltura pel fungo stesso fuori dell'organismo animale. Lo sviluppo dell' ifomiceta, quando però avviene su questi cereali e prodotti vegetali, di solito ne modifica così profondamente la forma, l' aspetto e i caratteri organolettici, da renderli assolutamente inadatti per l' alimentazione, non solo dell' uomo, ma degli animali in genere.

*Aspergillus flavescens*. — Le proprietà patogenetiche dimostrate dal *maiz* infetto coll' *aspergillus flavescens* isolato

dai cadaveri pellagrosi e inoculato negli animali per via peritoneale, sono nel loro complesso della stessa natura di quelle presentate dal *maiz* infetto di *aspergillus fumigatus* più sopra descritte. La sola diversità che esiste tra le proprietà patogene dei due ifomiceti introdotti nell'organismo animale unitamente al *maiz* su cui si erano sviluppati, consiste nell' intensità dei fenomeni, più gravi nel caso dell' *aspergillus fumigatus*, che in quello dell' *aspergillus flavescens*.

Occorrono di solito 3-4 cariossidi di *maiz* artificialmente avariato con *aspergillus flavescens* per ottenere la morte acuta, che avviene in 3-5 giorni, per una cavia di 500 gr. inoculata per via peritoneale.

Cavie dello stesso peso e inoculate con 2 cariossidi muoiono dopo 6-7 giorni circa; mentre spesso vivono se inoculate con una sola cariosside.

Le cavie, in genere, in seguito all' inoculazione anche di questo *maiz* aspergillare sono presto prese da diarrea e muoiono senza fenomeni convulsivi ben marcati. All'autopsia si ha un lieve essudato siero-sanguinolento nel cavo peritoneale, intensa congestione di tutti gli organi, e specialmente dell'intestino. Le cariossidi, se l' animale muore di forma molto acuta, cioè in 3ª giornata circa, sono ancora libere fra le anse intestinali, e in tal caso si avvera anche qui, come per l' *aspergillus fumigatus*, il passaggio dei germi comuni dall' intestino nel cavo peritoneale. Questa complicazione però col *maiz* avariato da *aspergillus flavescens* non è sempre costante anche nei casi di morte rapida, e di più i germi molto spesso si fermano nel peritoneo senza invadere la corrente sanguigna; il che indica, come già vedemmo per l' *aspergillus fumigatus*, che l' invasione dei germi è lieve, o è avvenuta solo di recente.

Nei casi di morte sub-acuta invece le cariossidi sono incapsulate tra le anse intestinali, fissatevi da aderenze fibrinose e avvolte da densi strati di sostanza d' aspetto caseoso, come nei casi già descritti per l' *aspergillus fumigatus*.

I conigli sono ancor più resistenti all'inoculazione di *maiz* infettato con *aspergillus flavescens*. Occorrono infatti non meno di 6-7 cariossidi avariate per ottenere la morte rapida di un coniglio di 1500 gr., la quale, di solito, avviene nel periodo di 1-3 giorni. Collo stesso numero di cariossidi, conigli del peso di oltre 2000 gr. muoiono di forma sub-acuta, cioè in 5-6 giorni,

e in tal caso presentano spesso dei fenomeni tetaniformi, però meno accentuati di quelli che si osservano nei conigli inoculati con *maiz* infettato coll' *aspergillus fumigatus.*

All' autopsia dei conigli si hanno le stesse lesioni che vedemmo nelle cavie; cioè, lesioni locali a caratteri di un processo flogistico diffuso, e mancanza di lesioni a forma tubercolare.

Con 3-4 e perfino 5 cariossidi, poi, i conigli adulti spesso sopravvissero, rimettendosi quasi completamente dopo un deperimento notevole avvenuto nel primo mese. Alcuni di questi conigli però sono morti 40 58 giorni dopo l' inoculazione, non ostante avessero riacquistato in parte, o anche del tutto, il loro peso di prima, presentando nelle ultime 24 ore circa dei fenomeni tetaniformi abbastanza gravi e caratteristici, molto simili a quelli che abbiamo osservato in seguito all'inoculazione di *maiz* avariato da *aspergillus fumigatus.* Coll' *aspergillus flavescens* tuttavia mi è sembrato che le scosse muscolari, invece di diffondersi a tutto il corpo, rimangano preferibilmente localizzate a gruppi di muscoli.

In questi casi di morte tardiva non si riscontrò di solito che un lieve stato di congestione di tutti gli organi interni. Le cariossidi, poi, che avevano determinato una peritonite fibrinosa localizzata ai punti di immediato contatto, erano avvolte da un sottile strato di sostanza caseosa. Mai si osservarono anche qui delle lesioni a caratteri tubercolari. Nessun germe si è mai isolato in questi casi, nè dal peritoneo, nè dai varî organi. L' ifomiceta si riscontrò vivente soltanto nell' interno delle cariossidi, come già si è visto anche per l'*aspergillus fumigatus.*

I cani poi presentarono quasi una refrattarietà completa all' *aspergillus flavescens* inoculato col *maiz.* Un cane giovane di 3700 gr. sopportò impunemente l' inoculazione intraperitoneale di 8 cariossidi fortemente avariate di recente, e un cane di 5 Kg. sopportò pure benissimo l' inoculazione di 10 delle stesse cariossidi.

I gallinacci pure presentarono un notevolissimo grado di resistenza all' inoculazione intraperitoneale di *maiz* avariato da *aspergillus flavescens.* Una gallina di 1460 gr. inoculata con 12 cariossidi, presentò diarrea e un lieve deperimento, ma poi si rimise quasi completamente nel periodo di 3 mesi.

Anche coll' *aspergillus flavescens* furono eseguite esperienze di confronto per determinare il grado di virulenza del parassita qualora venga inoculato negli animali isolatamente, non unito, cioè, al *maiz*.

Le ricerche di confronto poi erano rese in questo caso assai più necessarie che nel caso dell' *aspergillus fumigatus*, giacchè gli autori che fin qui studiarono l' aspergillosi sperimentale, si può dire che si occuparono quasi esclusivamente dell' *aspergillus fumigatus*, che, prima di queste mie ricerche sui pellagrosi, sembrava che fosse, se non l' unico, certo il più frequente e più importante agente etiologico dell' aspergillosi nell' uomo in genere.

Le ricerche di controllo anche per l'*aspergillus flavescens* sono state eseguite inoculando nel cavo peritoneale di cavie e conigli diverse dosi di emulsioni di spore dell' ifomiceta, che si ottennero facilmente dalle colture sul *maiz*. I risultati anche in questo caso, sebbene non in modo così evidente come si era visto coll' *aspergillus fumigatus*, dimostrarono che anche l'*aspergillus flavescens*, quando è inoculato in semplici emulsioni, ha proprietà patogene assai meno accentuate di quando venga inoculato col *maiz* stesso su cui si era sviluppato.

Nè con cavie, nè con conigli inoculati con forti dosi di emulsioni di spore non si arrivò mai a ottenere la morte in forma acuta, come si ottenne invece colla inoculazione di cariossidi avariate.

La morte più rapida degli animali avvenne nel periodo di 5-7 giorni, e senza mai determinare nè il passaggio dei germi comuni dall' intestino al cavo peritoneale e al circolo sanguigno, nè fenomeni convulsivi o tetaniformi.

All' autopsia di questi animali inoculati con emulsioni si riscontrarono lesioni aventi gli stessi caratteri di quelle riscontrate negli animali inoculati con emulsioni di *aspergillus fumigatus*, vale a dire: peritonite a forma tubercolare e invasione del parassita nei diversi organi vitali, specialmente nel fegato, milza e reni, dove si riscontrò sempre allo stato di micelî completi. Nel cavo peritoneale di animali, inoculati con emulsioni di spore di *aspergillus fumigatus* si riscontrò, inoltre, quasi costantemente un essudato siero-sanguinolento; mentre invece in quelli inoculati con emulsioni di spore di *aspergillus flavescens* molto di frequente si riscontrarono delle

vere emorragie intraperitoneali, che spesso erano causa di morte immediata.

Su questo ultimo particolare ho voluto richiamare l'attenzione perchè ha il suo riscontro nei fatti emorragici che abbiamo ritrovato più d'una volta nei cadaveri di pellagrosi nei quali appunto si era isolato l'*aspergillus flavescens*. Ricordo a tale proposito i fatti di pleurite emorragica in casi di marasma pellagroso, e più ancora i due casi di emorragia subdurale, descritti più sopra, in soggetti morti coi fenomeni di pellagra cronica riacutizzata.

In base anche ai risultati sperimentali ottenuti inoculando negli animali il *maiz* infetto di *aspergillus flavescens*, oppure emulsioni di spore dello stesso ifomiceta, noi dovremo quindi venire alle stesse conclusioni alle quali arrivammo in proposito coll'*aspergillus fumigatus*, vale a dire: il potere patogeno dell'ifomiceta aumenta notevolmente, e i suoi prodotti acquistano proprietà neuro-tossiche convulsivanti e caratteristiche, qualora esso possa entrare nell'organismo animale unitamente al *maiz* su cui si era sviluppato.

## Cap. II. — *L' attenuazione dei parassiti coltivati sul maiz.*

*Aspergillus fumigatus.* — L' *aspergillus fumigatus* che, come vedemmo, anche in minima quantità è capace, qualora venga introdotto nell' organismo animale unitamente al *maiz* su cui si era sviluppato da poco tempo, di elaborare dei tossici virulentissimi e dotati di un' azione elettiva speciale sul sistema nervoso centrale, va però rapidamente perdendo queste sue proprietà patogene coll' invecchiare delle colture stesse.

Già verso il quarto mese da che l' ifomiceta è stato coltivato sulle cariossidi di *maiz*, il suo potere patogeno presenta una sensibile diminuzione. Due delle cariossidi artificialmente avariate nell' Aprile 1901, e che ancora nel mese susseguente uccidevano un coniglio di 1500 gr. in meno di 24 ore, nei mesi di Agosto e Settembre successivi invece non produssero la morte di conigli del peso suddetto che in 7-8 giorni. La morte inoltre non fu preceduta nè da auto-infezioni, nè da fenomeni clinici caratteristici a carico del sistema nervoso centrale.

Nei mesi di Dicembre 1901 e nel Gennaio 1902, poi, vale a dire 8-9 mesi da che l' ifomiceta era stato coltivato sulle cariossidi, queste avevano perduto quasi completamente ogni loro proprietà patogena. In questi mesi infatti conigli di 1500 gr. sopportarono quasi impunemente due di quelle cariossidi che nell' Aprile 1901 erano state virulentissime. Gli animali inoculati, dopo una lieve diminuzione di peso determinatasi nelle prime due settimane, riacquistarono poi il loro peso normale rapidamente e, uccisi tre mesi dopo l' inoculazione, nulla di anormale si è potuto constatare nei loro diversi organi interni. Solo le cariossidi si rinvennero incapsulate da un denso strato di leucociti. Queste erano d' aspetto a un dipresso eguale a quelle che avevano prima di essere inoculate, e il parassita non si potè isolare che dalla loro parte inferiore.

Nei mesi suddetti occorsero otto di quelle cariossidi per ottenere la morte, in 45-55 giorni, di conigli di 1000 gr. Gli animali morirono in uno stato di cachessia assai accentuata colla perdita di circa la metà e più del loro peso, senza però la diarrea e senza alcuno dei sintomi caratteristici che determinano le cariossidi avariate di recente.

Davanti a questi fatti mi sono domandato se tali enormi diversità del potere patogeno delle cariossidi avariate coll'*aspergillus fumigatus* fossero dovute a una semplice attenuazione del fungo, indipendentemente dal suo terreno di coltura, o se invece fossero dovute a un esaurimento del materiale di coltura, nel senso che il parassita dopo qualche mese che viveva sulle cariossidi di *maiz*, potesse aver esaurito le sostanze ad esso necessarie pel presupposto esaltamento della sua virulenza. Sebbene le ricerche di Rénon avessero dimostrato che le spore provenienti da colture molto vecchie, di 3 anni circa, subiscono una vera e notevole attenuazione, la questione che mi si presentava mi apparve di massima importanza, specialmente dal punto di vista della patogenesi della pellagra; e per risolverla, nel Gennaio 1902 ricorsi alle seguenti esperienze:

Preparai due matracci contenenti 25 cc. d'acqua sterilizzata, e in uno introdussi 20 delle cariossidi di *maiz* avariate nell'Aprile 1901 e nell' altro 20 cariossidi avariate di recente. In quattro ore di macerazione a freddo e sbattendo continuamente i matracci potei ottenere una lavatura quasi completa delle cariossidi che, spogliate dalle spore dell' ifomiceta che

si trovavano sulla loro superficie esterna, apparivano così di aspetto presso che normale. In tal modo ottenni due emulsioni dense di spore, ciascuna delle quali venne iniettata nel peritoneo di tre cavie di 400 gr. circa, rispettivamente nelle proporzioni di 10, 7 e 2 cmc. I risultati di questa esperienza furono i seguenti:

Delle tre cavie che furono iniettate coll' emulsione di spore provenienti da coltura recente, la I$^a$ (inoculata con 10 cmc.) morì dopo 54 ore; la II$^a$ (inoculata con 5 cmc.) morì dopo 5 giorni, e la III$^a$ (inoculata con 2 cc.) morì dopo 7 giorni.

Delle tre cavie che furono iniettate coll' emulsione di spore provenienti da coltura di otto mesi, la I$^a$ (inoculata con 10 cc.) morì dopo 5 giorni, la II$^a$ (inoculata con 5 cc.) morì dopo 29 giorni, e la III$^a$ (inoculata con 2 cc.) morì dopo 35 giorni.

Le cariossidi avariate e così spogliate col lavaggio delle spore del parassita, furono in seguito rimesse nella stufa, poi, dopo 40 ore, vennero inoculate a dei conigli.

Orbene, conigli di 1500 gr. morirono di forma acutissima in meno di 28 ore e colla complicazione delle auto-infezioni, in seguito alla semplice inoculazione peritoneale di due cariossidi, sia di quelle che erano state infettate dall' Aprile 1901, sia di quelle che erano state infettate di recente.

Da questi ultimi risultati appare quindi evidente che trattasi realmente di una semplice attenuazione delle spore del parassita, il quale però, qualora possa trovare condizioni favorevoli di temperatura, ecc., può germogliare di nuovo anche sulle stesse cariossidi su cui si era attenuato, e riacquistare così la sua primitiva virulenza. Ciò corrisponde perfettamente alle esperienze di Kaufmann (14), il quale avea dimostrato che, riseminando su diversi mezzi nutritivi spore di aspergillo, prese da una coltura di sei mesi, esse riacquistano lo stesso potere patogeno di prima.

L' esperienza fu ripetuta nell' Aprile 1902 con cariossidi avariate con *aspergillus fumigatus* nell' Aprile 1901 e poi lasciate sempre alla temperatura ambiente. Le cariossidi che nei mesi di Dicembre 1901 e Gennaio 1902 s' erano mostrate pressochè innocue per attenuazione del fungo, avevano, anche rimanendo alla temperatura ambiente, riacquistata la loro virulenza, bastando ora due di esse per uccidere un coniglio di 1500 gr. in 28 ore circa. Questo fatto noi lo possiamo spiegare

in parte, almeno, coll' elevazione della temperatura che si ha nella primavera, la quale ha determinato sulle vecchie colture un nuovo germoglio del fungo e quindi una riproduzione di spore nuove, le quali, se recenti, come già da tempo Kaufmann aveva sperimentalmente dimostrato, sono sempre virulente anche provenendo da culture vecchie e attenuate.

L' attenuazione del germe fu studiata anche nei polli per via intestinale.

Vedendo nei risultati di queste mie ricerche la possibilità di spiegare le fasi di recrudescenza primaverile dei fenomeni pellagrosi nell' uomo, e ancora nei miei polli che da 3 anni sono sottoposti alla nutrizione di *maiz* avariato in genere, ho voluto rifare sui polli le esperienze sull' attenuazione del parassita, servendomi però ora non più dell'inoculazione diretta, ma dell' ingestione.

Per questo nel Gennaio 1902 provai ad alimentare due galline sane e adulte del peso di 1500 e 1420 gr., con *maiz* artificialmente avariato con *aspergillus fumigatus* dal Marzo 1901, e che all' inoculazione s' era presentato attenuato. Le galline nutrite con questo *maiz* per tutto il mese non diminuirono di peso, ma si mantennero sempre in buone condizioni generali, senza mai presentare neppure quella diarrea, tanto caratteristica nei polli sottoposti alla nutrizione di *maiz* infettato di recente con *aspergillus fumigatus*, come già abbiamo visto più sopra.

Per quanto mi sembrasse così dimostrato da queste mie esperienze l' importanza enorme che devono avere gli stati di virulenza e di attenuazione del fungo nella genesi e riacutizzazione dei fenomeni pellagrosi in genere, ho tuttavia voluto anche qui spingermi più oltre nel campo pratico della questione. Infatti ho voluto vedere se quell' esaltazione naturale del germe attenuato che dovrebbe avvenire coll' aprirsi della stagione primaverile, potesse realmente bastare per determinare nei polli, anche per via intestinale, quegli stessi fenomeni gravi che avevano determinato nei polli nutriti con *maiz* infettato di recente.

Per questo nell' Aprile 1902 ho sottoposto due altre galline normali alla nutrizione con quello stesso *maiz* che, infettato già dall'Aprile 1901 e somministrato poi ai polli nel Gennaio 1902, si era mostrato quasi innocuo.

Le due galline presentarono ben presto fenomeni diarroici, i quali, sebbene in sulle prime non fossero così accentuati e acuti come quelli che si hanno nei polli nutriti con *maiz* avariato di recente alla stufa, presero poi in seguito un decorso progressivo, raggiungendo, verso la fine dell' Aprile, il loro grado massimo.

A quest' epoca si dovette sospendere l' esperienza per mancanza di *maiz* preparato da più di un anno. I risultati però furono più che sufficienti per dimostrare come realmente il *maiz* avariato nella stagione primaverile è già attenuato, di modo che nella stagione invernale può essere somministrato quasi impunemente ai polli anche come alimento; nella primavera successiva, invece, anche se lasciato sempre alla temperatura ambiente, può di nuovo riacquistare il suo potere patogeno, come se fosse avariato di recente.

*Aspergillus flavescens.* — Assai più difficile è stato il poter determinare il grado di attenuazione che può subire l' *aspergillus flavescens* coltivato sul *maiz*, durante il periodo di un anno, giacchè i risultati fin qui ottenuti non solo non furono costanti, ma qualche volta anche contraddittorî.

Un campione di *maiz* sterilizzato e infettato nel Luglio 1901 con un *aspergillus flavescens* isolato di recente da un cadavere pellagroso, mentre anche nel secondo mese successivo presentava un notevole grado di virulenza, nel Gennaio 1902 era già diventato affatto innocuo. Cavie e conigli in questo mese sopportarono infatti quasi impunemente l' inoculazione intraperitoneale di 7 e perfino di 10 di quelle cariossidi, che qualche mese prima, in numero anche minore della metà, potevano essere micidiali. L' ifomiceta però in questo caso, riseminato in liquido di Raulin, aveva già perduto anche la proprietà di riprodursi.

Un secondo campione di *maiz*, invece, infettato pure nel Luglio 1901 con un *aspergillus flavescens* isolato da un altro cadavere, nel Gennaio 1902 non solo era ancora dotato della proprietà di riprodursi, ma conservava sempre lo stesso potere patogeno che aveva presentato pochi giorni dopo che era stato coltivato.

Riesaminato il potere patogeno di quest' ultimo campione di *maiz* nel Marzo successivo, si ebbero ancora gli stessi risultati ottenuti due mesi prima.

Un terzo campione di *maiz* infettato nell' Agosto 1901 con *aspergillus flavescens* isolato da un nuovo cadavere, rimase virulentissimo fino alla fine dell' Ottobre successivo. Riprovata la sua virulenza nel Febbraio 1902, cioè dopo 4 mesi circa, questa era diminuita alquanto. Collo stesso campione si ripeterono le inoculazioni negli animali nel Marzo successivo, e ora la virulenza del germe è apparsa di nuovo aumentata, e a un dipresso dello stesso grado che aveva presentato pochi giorni dopo la sua coltivazione sul *maiz*.

Le cause di questi risultati così diversi credo che sieno anche diverse e legate specialmente alle condizioni della temperatura ambiente e alle condizioni degli stessi mezzi nutritivi più o meno favorevoli alla riproduzione e alla vita del parassita. Siccome questi ifomiceti sono tanto più virulenti quanto più giovani sono le colture da cui provengono, si capisce come nell' inverno, la bassa temperatura degli ambienti essendo sfavorevole al loro sviluppo, debba influire diminuendo la loro virulenza. Così si spiegherebbe il ritorno della virulenza dell' *aspergillus flavescens* alla fine stessa dell' inverno, potendo questo germe vegetare anche a 14°-15°; mentre l' *aspergillus fumigatus* pel suo sviluppo ha bisogno di temperature più elevate, e che non si raggiungono che a primavera inoltrata.

Anche le diverse condizioni in cui si possono trovare i mezzi su cui fu coltivato il parassita, più o meno adatte alla sua vegetazione, credo, ripeto, che debbano pure notevolmente influire sullo stato di virulenza del parassita stesso. Accennerò in proposito a un fatto da me più volte osservato nel periodo di circa due anni, vale a dire che gli aspergilli, specialmente il *flavescens*, conservano anche più o meno a lungo la loro virulenza a seconda del grado igrometrico dello stesso *maiz* su cui furono coltivati. Come sul *maiz* troppo essiccato gli aspergilli non si sviluppano, così essi sul *maiz* troppo umido, o si sviluppano lentamente, o se si sviluppano anche in modo rigoglioso in principio, in seguito perdono rapidamente la loro vitalità e la loro virulenza. A questo fatto credo di dover attribuire la morte rapida del parassita seminato sul secondo campione di *maiz* di cui abbiamo parlato più sopra. A ogni modo è questa un' ipotesi che espongo colla massima riserva meritando la questione di essere studiata più profondamente, in particolar modo a proposito dell' *aspergillus flavescens*,

che fin qui dagli autori non fu preso in quella considerazione della quale apparve invece meritevole dal complesso di queste mie ricerche sulla pellagra.

Ad ogni modo noi possiamo fin d'ora concludere che anche la virulenza di questo parassita coltivato nel *maiz*, può sensibilmente variare nel periodo di un anno, diminuendo essa specialmente nella stagione invernale, e influire così anch' essa sul decorso dell' endemia pellagrosa.

## Cap. III. — *Ricerche di confronto.*

Scopo principale di queste ricerche fu di vedere se anche gli altri parassiti che si riscontrano comunemente sul *maiz* avariato, sieno capaci di acquistare proprietà patogene così accentuate e così caratteristiche come quelle degli aspergilli *fumigatus* e *flavescens*, qualora possano pure arrivare nell'organismo animale unitamente al *maiz* su cui si sono sviluppati.

È pure questa una questione del massimo interesse per l' etiologia della pellagra, e che io intendo di trattare più a lungo in uno speciale lavoro. Per ora mi basti di poter affermare che alcune esperienze eseguite inoculando sempre nel peritoneo di animali, cariossidi di varî campioni di *maiz* avariato, dai quali per mezzo di esami colturali poteva escludere gli aspergilli, mi hanno dato risultati negativi.

Conigli del peso di 1000 gr. poterono sopportare quasi impunemente l' inoculazione intraperitoneale di 8, 10 e perfino 12 cariossidi di *maiz* anche fortemente avariato, senza però la presenza degli aspergilli. Gli animali dimagravano un po' nei primi 15 giorni, ma poi in breve si ristabilivano completamente. Alcuni di questi furono uccisi dopo circa due mesi, ma nulla di notevole si rinvenne all' autopsia.

Le esperienze furono ripetute anche con *maiz* sterilizzato e poi infettato con *penicillum glaucum*, al quale oggi si dà tanta importanza nell' eziologia della pellagra, in base specialmente ai lavori di Gosio (58), Gosio e Ferrati (59), Ferrati (60) e Di-Pietro (24). Anche i risultati di queste ultime esperienze furono, possiamo dire, negativi; giacchè i conigli adulti hanno pure potuto sopravvivere all' inoculazione di 10 e anche di 12 cariossidi avariate dal suddetto ifomiceta,

presentando un semplice deperimento transitorio e senza mai dar segni di fenomeni neuro-tossici.

Su questo argomento, però, ripeto, mi riservo di ritornar presto, e per ora mi basti far rimarcare come gli aspergilli *fumigatus* e *flavescens*, che sono i soli germi che si riscontrano quasi costantemente negli organi interni dei cadaveri dei pellagrosi, sono i germi, non solo che in date epoche dell'anno, come già dimostrai più sopra, si sviluppano sul *maiz* guasto in modo da prendere una notevole preponderanza su qualsiasi altro parassita; ma, introdotti nell' organismo animale unitamente al *maiz* su cui si svilupparono, possono per di più raggiungere un potere patogeno assai più grande di quello che abbiano dimostrato gli altri parassiti che pure vivono comunemente sul *maiz* avariato.

Se noi aggiungiamo che gli aspergilli anche in minima quantità possono produrre sperimentalmente dei fenomeni neurotossici molto simili a quelli che si osservano nei pellagrosi, noi non solo siamo tenuti fin d' ora a dover dare ad essi un' importanza grande nell' etiologia della pellagra; ma siamo tenuti anche ad ammettere che i fenomeni più gravi e caratteristici, e la morte dei pellagrosi, siano determinati dall' infezione aspergillare e quindi anche a supporre che la pellagra possa non essere altro che un' infezione aspergillare.

Prima però di potere arrivare a questo concetto sulla patogenesi della pellagra, siccome noi oggi, dopo le geniali ricerche del Lombroso, dobbiamo ammettere che la pellagra sia in rapporto diretto coll' alimentazione maidica, così noi dovremo cercare se anche mediante l'ingestione di *maiz* avariato è possibile riprodurre una vera infezione aspergillare, la quale possa avere la stessa localizzazione e possa dar luogo a delle lesioni con caratteri, se non eguali, almeno molto simili a quelli che abbiamo riscontrato negli uomini morti di pellagra.

Nel capitolo seguente riassumo appunto i risultati da me ottenuti nelle cavie, conigli e polli, sottoposti all' alimentazione di *maiz* artificialmente avariato mediante aspergilli.

Cap. IV. — *L' aspergillosi sperimentale consecutiva all'ingestione, e suoi rapporti coll' aspergillosi nel pellagroso.*

L' ingestione fu sempre ritenuta una via poco adatta per l' infezione aspergillare; Grawitz (15), che fu il primo a occuparsi dell'argomento, non potè mai produrre l'aspergillosi coll' ingestione dell' *aspergillus fumigatus*. Lucet (16) su dieci esperienze non ottenne che una sola volta la morte degli animali per questa via, e anche in quel caso era stata determinata da lesioni polmonari e non intestinali.

Rénon (17) sottopose per 15 giorni continui sei conigli alla nutrizione di crusca mescolata a spore di *aspergillus fumigatus*, e solo due di questi animali morirono al 12° giorno. Uno non aveva alcuna lesione intestinale e presentava soltanto delle lesioni polmonari sotto forma tubercolare, come già Kaufmann aveva osservato in alcuni conigli nutriti con una miscela di avena e di spore. L' altro invece presentava solo delle lesioni tubercolari all' intestino.

Secondo Rénon, le lesioni polmonari in questi casi sarebbero primarie: le spore, separandosi dalla sostanza alimentare durante la masticazione, arriverebbero ai polmoni, inalate con l' aria inspirata.

A. Obici (4), che somministrò giornalmente delle sostanze alimentari mescolate a colture di *aspergillus fumigatus* a due cavie, a un coniglio e a due piccioni, ebbe i seguenti risultati:

Le cavie morirono dopo 9-15 giorni, presentando fenomeni di gastro-enterite catarrale acuta, e di più una semplice congestione di tutti gli organi interni, compresi i polmoni. In un caso esisteva però nel cavo peritoneale un abbondante essudato sieroso. Il coniglio morì dopo 23 giorni, e all'autopsia presentava un' enterite catarrale acuta, e di più un'infiltrazione aspergillare delle glandule mesenteriche. Nulla di notevole presentavano gli altri organi interni. Dei due piccioni infine ne morì uno solo dopo 2 mesi di nutrizione aspergillare, e questo non presentava che una congestione diffusa a tutti gli organi (polmoni, fegato, reni, ecc.) dai quali isolò l' aspergillo.

L' Obici poi ritiene che le lesioni polmonari siano d'origine secondaria e non già prodotte, come ammette Rénon, da spore che durante la masticazione delle sostanze infette vengano inalate nel polmone.

Ecco ora i risultati da me ottenuti mediante l' alimentazione di animali fatta con *maiz* artificialmente avariato con *aspergillus fumigatus* e con *aspergillus flavescens.*

Dodici furono le cavie sottoposte alla nutrizione di *maiz* infettato con *aspergillus fumigatus,* e tutte morirono nel periodo di 3 a 6 giorni. Di solito al 2°, o al più tardi al 3° giorno di osservazione, gli animali furono presi da diarrea, che andò sempre più aumentando fino all' ultimo momento di vita. La morte è sempre avvenuta quasi d'improvviso, fulminea, spesso preceduta da fenomeni di paralisi spastica diffusa a tutti gli arti, e da contratture tetaniformi.

All' autopsia si notò costantemente una congestione fortissima di tutti gli organi interni, e in modo particolare dell' intestino e dei polmoni.

La congestione delle pareti intestinali era diffusa a tutta la massa del tubo enterico, ma più intensa al tenue, che assumeva di solito un aspetto rosso-vermiglio cupo. Il contenuto intestinale era sempre liquido, qualche volta sanguinolento, e la mucosa presentava tutti i caratteri di un' enterite emorragica acuta, che ricordava assai bene quella già descritta sul principio di questa memoria nell' autopsia dei due polli morti per ingestione di *maiz* avariato comune. Il peritoneo è sempre apparso fortemente iniettato, e in qualche caso si notò nel cavo peritoneale anche qualche goccia di essudato siero-sanguinolento.

In due casi poi si ebbero inoltre i caratteri d' una peritonite fibrinosa acuta, senza che però mai si presentassero traccie di lesioni a forme tubercolari.

Lo stato di congestione polmonare è pure sempre stato imponente ed accompagnato generalmente da emorragie puntiformi e da veri focolai emorragici; in modo da ricordare le analoghe lesioni polmonari che si riscontrano quasi costantemente negli individui morti di pellagra acuta (tifo pellagroso).

In 8 delle nostre cavie, poi, appartenenti per la massima parte a quelle che sopravvissero più a lungo, oltre all' intensa congestione polmonare diffusa, si rinvennero dei veri focolai emorragici e flogistici, e questi ultimi coi caratteri d'una vera pneumonite lobulare, di solito allo stadio di epatizzazione rossa. In 3 di questi casi, contemporaneamente al processo pneumonico, esisteva un essudato pleurico fibrinoso

di data recente, che formava delle esili aderenze pleuriche. Il processo si estendeva in tutti e tre i casi anche al pericardio, che, come la pleura, appariva congesto, opacato, lievemente inspessito e con formazione di pseudo-membrane d' aspetto gelatinoso affatto eguali a quelle che si rilevano nei pellagrosi.

I caratteri di una pleurite fibrinosa acuta furono osservati inoltre anche in una cavia morta in 5 giorni, nella quale le lesioni polmonari consistevano in un semplice stato di intensa congestione diffusa.

I caratteri d' una lesione bronchiale mancavano in tutti questi casi, come mancavano pure delle lesioni, sia nel parenchima polmonare, sia nella pleura, che avessero forme tubercolari.

Riassumo ora in breve i risultati delle seminagioni fatte dagli organi interni di tutti questi animali nel liquido Raulin. In tutti i casi, sia in quelli morti con focolai pneumonici, sia in quelli con semplice congestione polmonare, dal parenchima polmonare si isolò abbondante l' *aspergillus fumigatus;* nei quattro casi di pleurite e pericardite fibrinosa, dall' essudato pleurico e pericardico si ottenne pure, e sempre in coltura pura, l' ifomiceta in abbondanza.

L' ifomiceta fu isolato pure dalla pleura di altri due casi nei quali questa sierosa non presentava che un intenso grado di iperemia. Dal fegato l' ifomiceta fu isolato tre volte, e due volte dalla milza, e da questi organi sempre in minima quantità. Dalla pia meninge fu isolato in tre casi e in quantità assai abbondante, sebbene questa non avesse presentato all' ispezione che un forte grado d' iperemia.

Dal peritoneo si fecero pure costantemente abbondanti seminagioni, sia con essudato siero-fibrinoso, sia con frammenti del peritoneo stesso. In sette casi si ebbe da queste colture peritoneali abbondante sviluppo del fungo.

Infine le seminagioni nel liquido Raulin furono sempre fatte anche col contenuto intestinale, e lo sviluppo del germe si ebbe costantemente, tranne in due casi. Fo qui notare l' importanza di questa mancanza del parassita nell' intestino delle due cavie, mentre era abbondantissimo nel polmone e sulle pleure. Ma su ciò ritornerò più avanti.

Furono fatte inoltre dagli organi di queste cavie seminagioni in brodo comune, e queste dimostrarono che in tre casi

soli l' *aspergillus fumigatus* dall' intestino era passato nel cavo peritoneale insieme agli altri germi, che normalmente abitano nell' intestino. Questi ultimi però non si riscontrarono nel circolo sanguigno che in un caso solo.

Negli altri 4 casi l'aspergillo fu riscontrato nel peritoneo in coltura pura, il che è una prova eloquente della facilità con cui questo parassita può attraversare le pareti intestinali e invadere l' organismo.

Alla nutrizione con *maiz* avariato con *aspergillus fumigatus* furono sottoposti anche dei conigli, ma senza risultati degni di nota, rifiutando questi animali una simile alimentazione. L'unico coniglio che si adattò all' alimentazione col *maiz* infetto di aspergilli, misto con abbondante crusca, morì dopo 12 giorni, senza però presentare i gravi fenomeni diarroici osservati nelle cavie.

All' autopsia di questo animale si notò una lieve congestione delle pareti intestinali. Alla porzione ileo-cecale per un tratto di qualche centimetro la parete intestinale era però disseminata da granulazioni miliari, biancastre.

I polmoni poi presentavano l' aspetto caratteristico della pseudo-tubercolosi miliare diffusa, con pleurite fibrinosa doppia.

Si fecero seminagioni dai varii organi. Dal contenuto intestinale, dal parenchima polmonare e dall' essudato pleurico si isolò abbondante l' ifomiceta in coltura pura.

Anche dei polli furono sottomessi all' alimentazione di *maiz* artificialmente avariato con *aspergillus fumigatus*, e due di questi furono tenuti a tale regime per più mesi. I risultati di queste esperienze sui polli, che hanno un interesse speciale per lo studio dei fenomeni cronici indotti dall'ifomiceta sull' organismo animale, saranno pure da me esposti più a lungo in un lavoro a parte. Qui mi limito solamente a dire che i polli resistono assai bene anche alla nutrizione di *maiz* aspergillare, pur presentando dei disturbi che corrispondono nel loro complesso a quelli che si osservano, nella primavera, nei polli sottoposti alla nutrizione di *maiz* comune avariato.

I polli nutriti con *maiz* aspergillare, infettato sempre di recente, già al 2° e 3° giorno presentano delle scariche diarroiche molto intense. Queste si accentuano sempre più, fino a che verso circa il 10° giorno si può dire che hanno raggiunto il massimo di intensità. Le evacuazioni sono allora

assai frequenti, abbondanti e costituite di un liquido mucoso contenente qualche volta delle striscie di sangue. Solo col lungo andar del tempo gli animali deperiscono e perdono le piume, specialmente, come vedremo a suo tempo, se sono lasciati esposti al sole.

La resistenza enorme dei polli al *maiz* aspergillare, sperimentata sia coll' inoculazione intraperitoneale diretta, sia colla nutrizione esclusiva e prolungata di *maiz* infettato, spiegherebbe la resistenza pure grandissima dei polli alla nutrizione anche del *maiz* naturalmente avariato, come io appunto, ripetendo le esperienze del Lombroso, ho potuto constatare in un numero notevole di animali che ora tengo in osservazione da circa tre anni.

Tutte queste ricerche sull' ingestione furono ripetute anche col *maiz* artificialmente avariato con *aspergillus flavescens*, e in genere possiamo dire che anche in questo caso i fenomeni che si osservarono negli animali furono a un dipresso di carattere eguale a quelli già descritti per gli animali sottoposti alla nutrizione di *maiz* infetto con *aspergillus fumigatus;* colla sola differenza che tutti i fenomeni furono meno accentuati e meno gravi.

Quattro furono le cavie sottoposte al regime suddetto e tutte morirono nel periodo di 15-18 giorni. La diarrea è comparsa in questi animali solo dopo 12-14 giorni da che si nutrivano di *maiz* aspergillare e tutte morirono, non in modo fulmineo come si era osservato colla nutrizione con *maiz* infetto con *aspergillus fumigatus*, ma presentando un periodo agonico di 12-24 ore circa.

Anche all' autopsia di queste cavie si riscontrò però una congestione intensa di tutti gli organi, e in modo particolare dell' intestino e dei polmoni, sebbene non in modo così marcato, come nelle altre cavie, morte con enterite acuta da *aspergillus fumigatus*.

I caratteri di una pneumonite lobulare si osservarono in tre casi, in uno dei quali essa era accompagnata da pleurite fibrinosa.

Nelle varie colture fatte nel liquido di Raulin dai varii organi di queste cavie si riscontrò la presenza dell' ifomiceta costantemente nei polmoni e nell' essudato pleurico. Nel peritoneo si isolò l' aspergillo in un caso solo, e in questo il germe

era scomparso anche dal contenuto intestinale. In nessun caso, come si constatò colle seminagioni fatte nei mezzi nutritivi comuni, si riscontrarono altri germi nei varii organi interni.

Alle esperienze sui conigli si dovette rinunciare rifiutandosi questi animali di alimentarsi con *maiz* avariato anche con *aspergillus flavescens*.

Le esperienze furono invece continuate coi polli, i quali si presentarono ancora più refrattarî che alla nutrizione di *maiz* infetto da *aspergillus fumigatus*. Solo dopo molti giorni sono comparsi i disturbi gastro-enterici, e anche questi si mantennero assai lievi, come risultò almeno dalle poche scariche diarroiche. Nessun altro disturbo degno di nota si rilevò in questi polli tenuti in osservazione per tre mesi.

Reperto microscopico. — Dell'intestino e del polmone specialmente delle cavie, che presentarono all'autopsia lesioni macroscopiche di carattere molto analogo a quelle riscontrate nei cadaveri di pellagrosi, furono fatte delle ricerche microscopiche, sia allo scopo di studiare meglio la natura delle lesioni, sia anche allo scopo di poter arrivare a una dimostrazione diretta dei parassiti nei tessuti stessi.

L'esame istologico dell'intestino mise in chiara evidenza le seguenti lesioni, localizzate in modo speciale al tenue: sfaldamento e necrosi più o meno accentuata dell'epitelio, abbondanti emorragie puntiformi disseminate in tutti gli strati delle pareti intestinali e in modo particolare nello strato sotto-mucoso e mucoso. Quasi tutti i villi dell'intestino erano grandemente rigonfiati alla loro estremità libera, in modo da assumere una forma di clava e nel loro interno contenevano abbondante essudato fibrinoso commisto a globuli linfatici e a residui di piccoli stravasi. È inutile che io qui richiami l'attenzione sull'analogia che le lesioni di questa forma di enterite emorragica presentano, sia con quelle già descritte più sopra nei polli morti in seguito a nutrizione di *maiz* guasto, sia in gran parte con quelle che il Vassale (18) descrisse nei pellagrosi.

Questa importante analogia apparirà poi ancora più evidente dalle lesioni intestinali a carattere cronico, determinate dagli aspergilli; ma di queste, come già dissi, tratterò in altra occasione.

L' esame istologico dei polmoni, che fu praticato tanto nei casi che all' autopsia presentavano un semplice stato di congestione diffusa, quanto nei casi che presentavano dei veri focolai di pneumonite, in genere non fece che confermare ciò che già si era riscontrato all' ispezione macroscopica. Trattavasi sempre o di una semplice iperemia del parenchima con focolai emorragici qua e là disseminati, oppure trattavasi di veri focolai flogistici, a uno stadio, di solito, incipiente, caratterizzati da necrosi delle cellule alveolari, da congestione e da una forte infiltrazione leucocitaria. Le lesioni erano sempre a forma diffusa, e non mai a forma tubercolare.

I fenomeni di reazione più accentuata furono però osservati più costantemente, anche nei casi di semplice congestione diffusa, lungo le pareti dei vasi e dei bronchi che presentavano sempre un' abbondante infiltrazione leucocitaria. Il lume dei bronchi tuttavia fu sempre riscontrato libero, sia da frammenti di sostanze alimentari, sia da prodotti patologici.

Nella porzione corticale del polmone si notavano invece di preferenza le lesioni più spiccate e più avanzate, diffuse generalmente alla pleura sovrastante, che appariva inspessita e fortemente infiltrata da elementi neoformati e da leucociti.

Le lesioni riscontrate nell'apparecchio respiratorio hanno avuto gli stessi caratteri tanto nelle cavie nutrite con *maiz* infettato con *aspergillus fumigatus*, quanto in quelle nutrite con *maiz* infettato con *aspergillus flavescens*. Così dicasi delle lesioni riscontrate nel tubo intestinale. Tuttavia dobbiamo dire che nel secondo gruppo di cavie, cioè in quelle nutrite con *maiz* avariato con *aspergillus flavescens*, l' enterite aveva un aspetto meno acuto che nelle prime, cioè in quelle nutrite con *maiz* avariato con *aspergillus fumigatus*

Le ricerche dei parassiti nei tessuti furono fatte specialmente mediante la tionina fenicata, ma i risultati di queste, eseguite su pezzi freschi e fissati subito dopo la morte degli animali, sono state in genere poco soddisfacenti. Solo nelle lesioni a forme nodulari, che si riscontrarono nell' intestino e nel polmone di un coniglio sottoposto alla nutrizione con *maiz* aspergillare, fu possibile il riscontro dell' ifomiceta, sotto forma di abbondanti micelî mescolati tra gli elementi d'infiltrazione.

Nelle lesioni a carattere diffuso riscontrate costantemente nelle cavie e che a noi maggiormente interessano, perchè di

carattere eguale a quelle che si hanno nei cadaveri dei pellagrosi, i reperti furono assai più scarsi e assai meno decisivi. Nell' intestino delle cavie anzitutto non si arrivò mai in questi casi a mettere in evidenza forme complete dei micelî dei due ifomiceti, anche quando l' esame colturale era stato positivo. Solo qua e là disseminate, sia tra i detriti di epitelio necrosato e posto alla superficie interna della mucosa, sia nel lume stesso delle glandule tubulari, si poterono osservare delle piccole forme sferiche, le quali pel loro aspetto, pel loro diametro e per la proprietà di colorarsi intensamente colla tionina, e pel fatto ancora che mancarono sempre nei preparati di intestino di cavie normali, potevano essere diagnosticate quali spore aspergillari.

Negli strati profondi delle pareti intestinali più difficile riesce diagnosticare la presenza di queste spore, che facilmente possono essere confuse con forme nucleari. Esse si riscontrarono però più facilmente nel tessuto sotto-mucoso, che in qualsiasi altro strato.

Come già feci per facilitare il riscontro dei germi nei tessuti dell'uomo, nello stesso modo anche qui ricorsi all' espediente di mettere per qualche ora i pezzi anatomici alla stufa, immergendoli nel liquido di Raulin, nel quale i tessuti conservano abbastanza bene la loro struttura e i loro rapporti, se anche vi rimangono per più ore. Basta lasciare i pezzi per 8-10 ore circa nella stufa e poi passarli nei liquidi fissatori, perchè si possa enormemente facilitare questa ricerca dei parassiti, i quali nel breve tempo che rimasero nella stufa ebbero tempo di passare dallo stadio di spora a quello di micelio. Per aver forme complete del fungo bisogna però lasciare i pezzi anatomici alla stufa a 38° un po' più a lungo, cioè 15-16 ore circa; mentre se si lasciano non più di 8-10 ore, tanto l' *aspergillus fumigatus*, quanto l' *aspergillus flavescens* si manifestano sotto forme ancora incomplete, vale a dire, sotto forma di filamenti corti, tozzi, che potrebbero anche sembrare frammenti di filamenti stessi, se non avessero spesso la forma di clava, indicante la prima fase di passaggio dalla spora al micelio. Tuttavia anche dopo una breve incubazione, in mezzo a queste forme corte se ne trovano di quelle abbastanza evolute, dei micelî abbastanza lunghi, sulla cui natura non si può ammettere dubbio alcuno.

In questi preparati il parassita si può facilmente riscontrare anche nella compagine dei varî strati delle pareti intestinali, e in modo speciale nello strato sotto-mucoso; nel quale si associano spesso dei veri gruppi di micelî. Questi filamenti si notano meno abbondanti negli altri strati della parete intestinale, cioè, nel tessuto di sostegno dei villi, tra le fibre muscolari dello strato profondo e nello strato sieroso. La *Fig.* 5 riproduce la sezione dell' intestino tenue di una cavia morta al 5° giorno di nutrizione con *maiz* infetto da *aspergillus fumigatus*. Il pezzo anatomico era rimasto 12 ore a 38° prima di essere fissato.

Non meno difficile è stata la ricerca dei parassiti nel tessuto polmonare delle cavie, sia quando era puramente congesto, sia quando aveva i caratteri d'un processo flogistico diffuso. Questo fatto era del resto già stato notato da Grawitz (15), da Lichtheim (19), da Kaufmann (14), e da Rénon (20), il quale ultimo affermò in proposito che l'origine aspergillare delle lesioni polmonari non può essere stabilita che per mezzo di risultati colturali.

E infatti, anche nei nostri preparati fatti con pezzi anatomici che erano stati direttamente fissati senza il passaggio alla stufa, non ci fu affatto possibile mettere in evidenza nel parenchima polmonare la presenza del fungo, non solo sotto forma di filamenti, ma neppure sotto forma di spore. Soltanto nell' essudato pleurico, sopratutto in un caso, ci è sembrato di osservare delle forme sferiche che aveano tutto l' aspetto di spore aspergillari, e qualche raro frammento di micelî, corti e assai poco colorabili.

La dimostrazione dei parassiti è stata invece assai facilitata anche nel parenchima polmonare, lasciando i pezzi anatomici, prima del fissaggio, per 10-12 ore a 38°, immersi nel liquido Raulin. In questi preparati, fatti anche con polmoni che all' ispezione macroscopica non presentavano che un notevole grado di congestione diffusa, i parassiti furono riscontrati assai numerosi sotto forma di micelî anche abbastanza lunghi, come già si erano osservati nelle pareti intestinali delle cavie stesse e nel parenchima polmonare dei pellagrosi.

I micelî non sono però mai disseminati nel tessuto polmonare in modo uniforme; ma essi abbondano in modo particolare nel tessuto peri-bronchiale e peri-vasale, qualora

questo presenti un' infiltrazione leucocitaria. Nel lume dei vasi e dei bronchi, però, non furono mai osservate traccie del parassita.

Negli alveoli e nei setti alveolari i micelî si riscontrano a gruppetti assai scarsi e quasi esclusivamente in corrispondenza dei focolai flogistici. Abbondano invece costantemente questi parassiti nelle zone corticali del polmone, sia nei punti in cui esistono già dei fenomeni di una vera reazione flogistica, sia nei punti in cui questa reazione non è rappresentata che da uno stato di congestione dei vasi. Dalla *Fig. 6* possiamo avere un' idea esatta di questi fatti. La preponderanza dei germi nella zona corticale dei polmoni fu un fatto costante, il quale spiegherebbe la facilità con cui si riscontrarono negli animali le lesioni pleuriche sopra descritte.

Questo fatto, sui cui richiamo l' attenzione in modo particolare, perchè potrebbe anche spiegare la facilità con cui anche nei pellagrosi si osservano delle lesioni pleuriche di natura aspergillare, probabilmente è dovuto a una minore reazione fagocitaria che avviene nelle zone corticali del polmone, in confronto a quella abbondantissima che si ha in tutto il resto del tessuto polmonare.

Confrontando ora i miei resultati qui sopra esposti, ottenuti coll' alimentazione di *maiz* avariato sia da *aspergillus fumigatus*, sia anche da *aspergillus flavescens*, con quelli ottenuti dagli altri autori che nutrirono gli animali con diverse altre sostanze alimentari mescolate a spore o a colture di *aspergillus fumigatus;* risulta evidente anzitutto come l'infezione aspergillare nei nostri animali sia stata più costante e abbia avuto un decorso più acuto, determinando anche delle lesioni più gravi e più diffuse di quelle che erano state prima osservate.

Ho in corso delle esperienze di confronto in proposito, fatte allo scopo di poter stabilire con sicurezza se realmente l' alimentazione con *maiz* avariato da aspergilli sia più letale e produca effetti più acuti e accentuati che l' alimentazione fatta con altre sostanze mescolate puramente a spore o a colture aspergillari. Mi riservo quindi di ritornare più tardi sull'argomento e ora mi limito a far rilevare come le lesioni ottenute nei nostri animali e in modo particolare nelle cavie, abbiano caratteri, si può dire, perfettamente eguali a quelli

che si riscontrano nei cadaveri di pellagrosi, specialmente nelle forme di infezione aspergillare acuta, cioè, nei casi di tifo pellagroso.

Le lesioni specifiche e caratteristiche, costanti e accentuate che si sono riscontrate nei polmoni e qualche volta anche sulle pleure, pericardio e meningi dei suddetti animali, meritano la nostra attenzione, giacchè queste furono anche nell' uomo pellagroso le più frequenti e le più caratteristiche dell' infezione aspergillare.

Se queste lesioni sono eguali nei loro caratteri e nella loro natura tanto nel pellagroso, quanto negli animali nutriti di *maiz* aspergillare, molto probabilmente avranno anche la stessa origine. Per questo ci si presenta ora subito la questione di stabilire se l'aspergillosi polmonare, e quindi anche l'aspergillosi delle pleure e delle meningi, prodotta sperimentalmente coll' ingestione, sia da ritenersi di origine primaria, come ammette Rénon, oppure di origine secondaria, come ammette Obici.

Nei nostri reperti mancano prove di fatto che possano venire, in appoggio all' idea di Rénon, il quale ammette appunto che l' infezione polmonare in questi casi sia da considerarsi esclusivamente in rapporto a spore che durante la masticazione vennero inspirate nel polmone stesso. L' ipotesi di Rénon non è stata però ancora dimostrata.

I miei reperti starebbero invece a dimostrare come la infezione polmonare debba essere secondaria, a quella di origine intestinale. Abbiamo visto infatti quanto sia facile e frequente il passaggio di spore aspergillari traverso le pareti intestinali. Ciò lo abbiamo dimostrato per mezzo delle colture fatte dall' essudato peritoneale o dal peritoneo stesso allo stato di semplice congestione, come pure lo abbiamo dimostrato per mezzo delle ricerche dei parassiti penetrati nei varî strati delle pareti intestinali. L'esame colturale dimostrò pure, tanto nelle cavie, quanto nell' uomo, come i parassiti si possano rinvenire anche nei diversi organi vitali, milza e fegato specialmente. Obici poi in un caso rinvenne il parassita anche nel sangue; per cui non sarebbe improbabile, che questi aspergilli, eminentemente aerobici, dall' intestino passati alle vie sanguigne o linfatiche, potessero localizzarsi nel polmone a preferenza che in qualsiasi altro organo, e quindi passare alle sierose che lo avvolgono.

Tale questione che presenta un interesse capitale specialmente per ciò che riguarda la profilassi della pellagra, fu tuttavia definita, e credo in maniera decisiva, soltanto dai risultati di una nuova serie di esperienze, colle quali arrivai a determinare la morte degli animali introducendo i parassiti nell' apparato digerente per mezzo di sonde, seguendo la via rettale, in modo da eliminare ogni possibilità di un' infezione polmonare primaria.

Quattro cavie furono perciò sottoposte a iniezioni rettali di 3 cmc. di un' emulsione concentrata di spore recenti di *aspergillus fumigatus*, chiudendo in seguito lo sfintere anale con un punto di sutura, per impedire l' immediata espulsione del materiale. Il punto di sutura si levò però dopo circa 6 ore.

In due cavie adulte di 500 gr. l' iniezione fu ripetuta due giorni di seguito, e di queste, una morì dopo 46 ore e l' altra dopo 92 ore.

Nelle altre due cavie, giovani, di 300 gr., l' iniezione fu fatta una volta sola e la morte avvenne dopo 39 e 42 ore.

Questi quattro animali all'autopsia presentavano un essudato peritoneale siero-sanguinolento e una forte congestione di tutti gli organi interni, in modo speciale dell' intestino e dei polmoni. L' intestino crasso e i polmoni presentavano inoltre numerosi e diffusi focolai emorragici; avevano, cioè, le stesse lesioni che riscontrammo nelle cavie morte per ingestione di *maiz* aspergillare.

L' esperienza fu ripetuta sopra altre due cavie giovani del peso di circa 300 gr., alle quali si iniettarono per via rettale 5 cmc. di un' emulsione condensata di spore recenti di *aspergillus flavescens*. Le due cavie morirono quasi contemporaneamente alla fine del terzo giorno, presentando a un dipresso le stesse lesioni osservate nelle prime quattro cavie. L' esame colturale, fatto seminando abbondanti pezzi dei varii organi, ecc., dimostrò costantemente la presenza degli aspergilli nell' essudato peritoneale; tranne in un caso, in quello della cavia morta al quarto giorno.

Il maggior sviluppo di colonie aspergillari in tutte queste cavie si ottenne però dalle seminagioni fatte dal parenchima polmonare e dalle pleure.

Dal cervello e specialmente dalla pia si isolarono pure abbondanti aspergilli in tre cavie trattate coll' *aspergillus fumigatus*, e in una di quelle trattate coll'*aspergillus flavescens*.

Dal sangue, dal fegato e dalla milza gli aspergilli si isolarono in un caso solo; come pure si isolarono in un caso solo, e precisamente in quello della cavia morta rapidamente in 42 ore, dal contenuto intestinale. Negli altri quattro casi il contenuto intestinale diede sempre risultati negativi, e su questo particolare richiamo, di nuovo, l' attenzione in modo speciale, perchè dimostra la rapidità con cui le spore dei due aspergilli in discorso possono attraversare le pareti intestinali, spiegandosi così, come anche nei pellagrosi, morti coi caratteri più evidenti di un' aspergillosi polmonare o pleurica o meningea, generalmente il reperto intestinale sia stato negativo.

Dopo questi risultati non credo ora possibile dubitare della origine intestinale dell' infezione aspergillare che si osserva, sia nell' uomo pellagroso, sia negli animali sottoposti all' ingestione del germe.

Quali sono le condizioni per le quali questi aspergilli patogeni entrando nell' organismo animale possono determinare ora un' infezione acuta con lesioni infiammatorie a carattere diffuso, come si ha appunto nei pellagrosi, ora determinare invece un' infezione cronica con lesioni infiammatorie a carattere tubercolare, come si ha generalmente nell' aspergillosi polmonare comune? Senza avere la pretesa di risolvere una sì importante e oscura questione, accenno qui ad alcuni fatti che forse ci potranno mettere sulla via di trovare una spiegazione.

Dal complesso dei reperti microscopici e colturali fin qui da me descritti è apparso evidente come nei tessuti colpiti da un processo flogistico aspergillare a carattere diffuso, sia nell' uomo pellagroso, sia negli animali di esperimento, non fu mai possibile riscontrare delle forme parassitarie complete, di micelî che parlino per una vera e abbondante proliferazione degli aspergilli, avvenuta nell'organismo vivente, come si osserva invece nelle forme di aspergillosi a carattere tubercolare.

Noi abbiamo dimostrato ancora come solo dopo la morte dei tessuti, si possa in questi casi ottenere artificialmente la vegetazione del fungo, e non di raro abbiamo potuto cogliere in questo modo la trasformazione di spore aspergillari in micelî; per cui dovremo fin d' ora ammettere che la proprietà di determinare le lesioni flogistiche diffuse sia legata specialmente alle spore aspergillari.

Siccome però queste lesioni sono localizzate a organi non prettamente vitali, cioè pleura, pericardio, ecc. così dovremo ammettere ancora che la morte degli animali e dei pellagrosi sia determinata da tossici elaborati dalle spore aspergillari.

Questo fatto avrebbe molta analogia con ciò che avviene inoculando nell' animale le cariossidi infette da aspergilli, nel qual caso, come vedremo nel capitolo seguente, la morte non può essere determinata che da prodotti tossici elaborati dal parassita, e probabilmente anche qui dalle spore, che rimangono sempre localizzate alla cariosside inoculata.

Il fatto importante che ci colpisce ora è il modo diverso con cui verrebbero a comportarsi le spore aspergillari a seconda della via che seguono per entrare nell' organismo animale.

Come abbiamo visto poc' anzi, noi abbiamo un' infezione aspergillare a decorso lento e a caratteri tubercolari se si inietta un' emulsione di spore aspergillari nel cavo peritoneale. Se invece facciamo ingerire alle cavie del *maiz* infetto di aspergilli, oppure iniettiamo, per la via del retto, nel tubo intestinale un' emulsione di spore eguale alla prima, noi abbiamo un' infezione aspergillare acuta e a carattere flogistico diffuso.

La vera ragione di questo interessante fenomeno apparirà soltanto da ulteriori ricerche, e per ora mi accontento d' aver su di esso richiamata l' attenzione, perchè sembrami che possa avere una grande importanza patogenetica nell' infezione aspergillare dei pellagrosi.

Fin qui noi abbiamo trattato dell' infezione aspergillare del polmone, della pleura, del pericardio, delle meningi, ecc., quale causa della morte della massima parte dei pellagrosi.

Vediamo ora l' importanza diretta che può avere una infezione aspergillare del tubo gastro-enterico nel determinare i fenomeni del cosidetto intossicamento maidico.

Abbiamo dimostrato come in alcune specie di animali, specialmente nei gallinacei, si possano ottenere dei gravi e caratteristici fenomeni, in seguito puramente a una enterite aspergillare (diarrea, perdita di peso, perdita di piume, ecc.) senza che il germe si localizzi in altre parti dell' organismo e dia la morte dell' animale.

Se poi anche nel pellagroso un'enterite aspergillare possa bastare per determinare dei gravi fenomeni generali, analoghi a quelli che si hanno, p. es., nella pleurite aspergillare, noi non abbiamo ancora alcun dato nè pro nè contro per poterlo affermare.

Solo la frequenza con cui si sono riscontrati i parassiti nelle feci dei pellagrosi durante specialmente la fase della recrudescenza massima dell' endemia pellagrosa, in sul principio dell' estate, ci potrebbe autorizzare a credere che anche un'infezione aspergillare localizzata all' intestino possa bastare per determinare anche nell'uomo dei gravi fenomeni analoghi a quelli che si hanno nel pellagroso colpito da aspergillosi polmonare o pleurica. Siccome però la presenza dei germi nell' intestino dei pellagrosi, per quanto assai frequente, pure non è stata costante, così credo per ora impossibile definire tale questione.

A me basti quindi aver dimostrato come l' ultima fase del pellagroso coincida quasi costantemente con un' infezione aspergillare acuta o sub-acuta, generalmente letale, in rapporto col decorso della pellagra stessa, e localizzata prevalentemente all'apparato respiratorio, alle sierose che lo avvolgono e alla pia meninge, e di aver cercato di spiegare il meccanismo col quale questa infezione avviene.

La quantità dei parassiti e specialmente delle spore che possono essere introdotti nell' organismo coll' ingestione, deve avere tuttavia ancora un' importanza non indifferente nel determinare l' infezione; giacchè, come è risultato anche dalle nostre ricerche sulle feci dei polli, pare che le spore quando arrivano nell' intestino in lieve quantità, non possano mai determinare dei disturbi e delle lesioni così gravi, come quando vi arrivano in quantità considerevoli.

Noi abbiamo visto come in ambienti anti-igienici in dati periodi dell'anno abbondino in modo straordinario tanto l'*aspergillus fumigatus*, quanto l' *aspergillus flavescens*, e abbiamo visto ancora con quale facilità e rapidità questi parassiti in determinate epoche dell'anno si possano sviluppare, anche alla temperatura dell' ambiente, sia sul *maiz* sano, sia sulla polenta fatta con farina di *maiz* sano. Basta infatti, come dimostrai fin dal principio di questa Memoria, lasciare della polenta

fresca esposta anche per poche ore negli ambienti poco igienici, perchè la sua superficie si ricopra quasi completamente di spore dei parassiti. Per cui non dovrà fare alcuna meraviglia se un uomo che si nutre a base di *maiz* e che vive in ambienti anti-igienici, come avviene di solito del pellagroso, si trovi esposto all' infezione aspergillare, trovandosi egli, ripeto, a un dipresso nelle stesse condizioni in cui si trova l' animale d'esperimento sottoposto alla nutrizione di *maiz* artificialmente infettato cogli stessi elementi patogeni.

Da ciò risulta evidente l' azione nociva degli alimenti a base maidica (polenta e pane) anche se preparati con farine sanissime, qualora l' ambiente in cui si conservino sia favorevole per lo sviluppo dei germi.

A questo punto dovrei dire qualche cosa sulla resistenza dei parassiti agli agenti esterni, specialmente al calore; giacchè viene quì spontaneo il quesito quale sia l' importanza etiologica che possano avere in questa infezione quei germi che si sviluppano nel *maiz* e nelle farine e che poi dovettero, durante la preparazione del pane e della polenta, sottostare a temperature elevate.

Su questo argomento, che nella questione specialmente profilattica della pellagra offre un interesse singolare, mi propongo pure di ritornare in altra occasione.

Voglio però fin d' ora ricordare la grande resistenza in genere delle spore dell' *aspergillus fumigatus*, dimostrata da Lucet e da Rénon. In quanto ai risultati delle mie ricerche in proposito, dirò qui soltanto che da esse apparve evidente che le spore dei due aspergilli in questione, se sottoposte all' ebollizione anche per 10 15 minuti, possono presentare ancora delle proprietà patogene, sebbene attenuate, sia che vengano inoculate direttamente nel peritoneo dell'animale, sia che vengano introdotte nell' organismo per via del tubo intestinale. Due cavie giovani, del peso di 350 gr., alle quali erano stati inoculati per via rettale 7 cmc. di una emulsione di spore di *aspergillus fumigatus* sottoposta prima all' ebollizione per 10 minuti, morirono dopo 44-47 ore con una infezione aspergillare localizzata, come al solito, in modo speciale al polmone. I germi, anche in questi casi, non furono più reperibili nel contenuto intestinale, ma si rinvennero nell'essudato peritoneale e specialmente nel parenchima polmonare. Anche nella massa cerebrale furono rinvenuti i parassiti sebbene in poca quantità.

Anche la presenza quindi delle spore aspergillari nelle farine, specialmente se la elevata temperatura a cui vengono sottoposte durante la preparazione del pane e della polenta, non è stata molto prolungata, può avere un' importanza etiologica nell' infezione specifica dei pellagrosi. Ma su questo punto della questione, ripeto, ritornerò più tardi.

Un secondo fattore di cui noi dobbiamo tener conto quale causa determinante dell' infezione aspergillare nell' uomo, deve essere certamente il diverso grado di virulenza dei parassiti, da noi pure dimostrato nei diversi periodi dell' anno.

Come si è visto negli animali, non basta che il parassita sia ingerito cogli alimenti anche in quantità considerevole, per determinare un' infezione, ma occorre che il germe sia anche virulento. La prova di questo fatto sperimentale la troviamo nei reperti delle nostre ricerche fatte sulle feci dell' uomo stesso durante l' inverno, essendosi in questo periodo dell' anno riscontrato il parassita anche in individui che non presentavano disturbi degni di nota.

Fra le concause determinanti l' infezione aspergillare nell' uomo, rimarrebbe ancora ad accennare all' influenza che può avere per sè stessa l' alimentazione maidica nel predisporre e nell' esagerare i fenomeni dell' infezione aspergillare.

Per quanto i risultati delle mie esperienze più sopra esposte dimostrino chiaramente che il parassita entrando nell' organismo animale unitamente al *maiz* su cui si era sviluppato, viene a trovarsi in una condizione assai favorevole per esplicare le sue proprietà patogene e per elaborare dei tossici virulentissimi, tuttavia, in base a questi, non mi ritengo autorizzato ad ammettere che l' alimentazione maidica possa realmente influire a predisporre l' organismo all' infezione e ad aggravare il decorso e i fenomeni dell' infezione stessa.

Esponendo quei risultati ho accennato alla possibilità di un' esaltazione della virulenza del parassita, che questo verrebbe ad acquistare nel caso che possa elaborare i suoi tossici nell' organismo animale, usufruendo anche dei principii maidici contenuti nella stessa cariosside. Se non che a tale ipotesi facevo seguire i risultati di altre ricerche colle quali

dimostravo che i gravi fenomeni di intossicamento, la morte fulminea degli animali, non si avevano nè inoculando il parassita e la cariosside in due punti diversi dell' organismo, nè iniettando nel cavo peritoneale un' emulsione di spore e di farina di *maiz* sterilizzata.

La presenza della cariosside quindi nell' organismo animale non può avere che un' importanza relativa nell' esagerare il potere patogeno degli aspergilli, e noi non possiamo perciò, fino a nuove prove, attribuire all' alimentazione maidica una proprietà speciale nel predisporre all' infezione aspergillare, o nell' aggravarla quando sia già in corso.

Nel capitolo precedente, dimostrando come l' infezione polmonare, pleurica, ecc., dei pellagrosi sia dovuta a spore aspergillari, provenienti dal tubo intestinale, facevo rimarcare inoltre come si possano avere dei fenomeni acuti negli animali, molto analoghi a quelli che si hanno nelle forme di pellagra acuta, e pure molto analoghi a quelli che si hanno inoculando direttamente negli animali le cariossidi infette, anche se si determina l' infezione polmonare, ecc., con iniezioni di semplici emulsioni di spore aspergillari, eseguite per via rettale.

Su questo fatto ho richiamato in modo particolare l' attenzione, facendo rimarcare la grande diversità dei fenomeni che si ottengono, se in animali della stessa specie si introducono anche delle semplici emulsioni di spore aspergillari, qualora si inoculino per via peritoneale oppure per via rettale. Nel capitolo seguente vedremo poi meglio come inoculando delle emulsioni di spore aspergillari nel retto di una cavia si ottengano dei fenomeni acuti molto analoghi a quelli che si ottengono inoculando le cariossidi infette nell' organismo dello stesso animale; per cui pel momento non possiamo affatto spiegare con un' esaltazione della virulenza del parassita i fenomeni di intossicamento acuto che si hanno coll' inoculazione di cariossidi infette; potendo noi, ripeto, ottenere fenomeni analoghi anche inoculando solamente il parassita, senza l' unione del *maiz*, al quale si potrebbe attribuire la proprietà di esaltare il potere patogeno del parassita stesso.

Cap. V. — *Immunizzazione sperimentale contro l'aspergillosi. Proprietà terapeutiche del siero. Primi tentativi di siero-terapia nella pellagra.*

Sebbene questa parte debba formare oggetto di una prossima mia pubblicazione, nella quale esporrò in tutti i loro dettagli i risultati delle mie esperienze, molte delle quali ancora in corso, sull' immunizzazione sperimentale contro gli aspergilli *fumigatus e flavescens,* non che i risultati delle esperienze sulle proprietà immunizzanti e terapeutiche del siero degli animali immunizzati; tuttavia credo opportuno di accennare fin d' ora a questi miei reperti, per il valore scientifico e pratico che possono avere nella questione della pellagra.

Il primo che abbia dimostrato che contro l' aspergillosi sperimentale e precisamente contro l' *aspergillus fumigatus,* si possa ottenere un grado di immunità per quanto relativa, è stato Rénon (21), che fin dal 1895 ha voluto tentare la immunizzazione nelle cavie e nei conigli, sottoponendoli sia a iniezioni del parassita attenuato, sia a iniezioni progressive del parassita virulento.

I risultati di Rénon però furono nel loro complesso poco incoraggianti e l' immunità da lui ottenuta è sempre stata, ripeto, molto relativa. Gli animali sottoposti alle iniezioni immunizzanti, se venivano in seguito iniettati con dosi mortali di germi virulenti, poterono sopravvivere soltanto qualche giorno più a lungo degli animali di controllo.

Più tardi l' Obici nel 1896 (4) confermò come realmente si possa ottenere una vera immunità contro l' *aspergillus fumigatus.* Questa immunità tuttavia, anche secondo le ricerche di Obici sarebbe sempre di un grado assai debole e di più, scomparirebbe dopo un breve periodo di tempo.

Rénon poi studiò anche il potere immunizzante del siero di sangue estratto da un coniglio morto di aspergillosi, inoculando il detto siero a due altri conigli. Questi conigli però in seguito all' iniezione dell' ifomiceta virulento morirono ancora dopo 11-12 giorni, come di solito. L' A. stesso si astiene dal fare degli apprezzamenti sul valore dei suoi risultati.

Nel mio lavoro completo sull' immunizzazione sperimentale contro gli aspergilli *fumigatus* e *flavescens,* esporrò anche

i risultati da me pure ottenuti specialmente nei conigli, alcuni dei quali poterono in seguito, dopo l'immunizzazione, sopportare quasi impunemente doppie dosi mortali dei due aspergilli allo stato della loro massima virulenza.

I risultati più confortanti furono a ogni modo ottenuti, negli animali superiori, specialmenle nelle capre, nelle pecore e nei cavalli; ai quali ricorsi, anche colla speranza di arrivare a una siero terapia pratica nella pellagra.

Non mi fermerò sulla tecnica del processo da me tenuto nell' immunizzazione, nè sui fenomeni di reazione degli animali, riservandomi di trattarne a lungo nel lavoro completo. Mi basterà qui far conoscere alcuni fatti che dimostrano le proprietà immunizzanti e terapeutiche del siero di sangue di questi animali quando hanno raggiunto un determinato grado di immunità specifica.

Riferirò in breve a tale scopo i risultati di una esperienza assai importante, eseguita con 4 pecore e 4 capre, iniettate nello stesso giorno con 5 cmc. di una medesima emulsione concentrata, fatta con spore virulente di *aspergillus fumigatus*.

Due pecore e due capre furono tenute come termine di confronto e le altre due pecore e due capre vennero iniettate nello stesso momento anche con siero di sangue anti-aspergillare, ottenuto da un cavallo immunizzato.

I quattro animali di controllo il giorno susseguente alla iniezione erano assai abbattuti, e la loro temperatura da 38° era salita a 41°. In seguito la temperatura oscillò per 18 giorni continui tra i 40° 41° e più.

Gli animali invece, che contemporaneamente all' inoculazione del germe avevano avuto anche l' iniezione del siero anti-tossico, nel giorno susseguente non presentavano fenomeni di abbattimento, nè rialzi di temperatura.

A questi ultimi animali nel periodo di 15 giorni si ripeterono poi altre cinque iniezioni di 10 cmc. di siero. Tanto le capre, quanto le pecore presentarono sempre in tutto questo periodo di tempo una temperatura presso che normale, che solo in due casi arrivò un giorno ai 39°.

La modificazione che si ha nei fenomeni di reazione locale all' aspergillosi, negli animali inoculati con siero specifico, presenta certo un valore non meno interessante della modificazione che si verificò nei fenomeni di reazione generale; ma di quelle pure parleremo a suo tempo.

Solo ho voluto accennare ai risultati di queste mie ricerche sperimentali sull'immunizzazione degli animali, per giustificare la speranza che noi nutriamo di vederci così aperta la via per una cura razionale specifica anche nell' uomo pellagroso, ricorrendo appunto al siero anti-aspergillare.

Già tre anni or sono, quando non avevo ancora alcuna prova che un processo infettivo potesse avere sì grande importanza nella patogenesi della pellagra, ma in base puramente alla teoria tossica di questa malattia, ho voluto sperimentare l' azione del siero di sangue di individui guariti da pellagra, iniettato in pellagrosi in atto. Le esperienze furono ripetute in quattro casi di pellagra sub-acuta e anche in due casi di tifo pellagroso; ma per quanto le recenti esperienze di Babes (22) sull' azione neutralizzante del siero di sangue di pellagrosi guariti cogli estratti del *maiz* guasto, quelle di Antonini e Mariani (23), sul potere anti-tossico del siero di sangue dei pellagrosi guariti, rispetto al potere tossico del sangue di pellagrosi in atto, come quelle ancora del Di-Pietro (24) sul potere antitossico del siero dei pellagrosi guariti, osservato in una cavia inoculata con veleno penicillare, sembrino parlare in favore di questo metodo di siero-terapia nella pellagra, in nessun caso io ho ottenuto dei risultati degni di essere presi in seria considerazione.

Solo posso notare che in un caso di tifo pellagroso in cui si erano praticate 5 iniezioni di siero, si ebbe verso la fine della seconda settimana, una graduale diminuzione dei fenomeni acuti col passaggio però ad uno stato marasmatico che determinò due mesi dopo la morte dell' infermo.

Ho ora invece iniziato da circa tre mesi i primi tentativi di siero-terapia nei pellagrosi, ricorrendo, come già dissi, al siero anti-aspergillare, e fin qui i casi curati con questo metodo sono sette.

Sei casi erano di forme sub-acute abbastanza gravi, con eritema tipico, diarrea o stipsi e con gravi disturbi psichici.

In tre di questi si aveva un semplice aumento del tono muscolare e un lieve grado di ipotermia. Negli altri tre invece un forte aumento del tono muscolare, tremori intensi e lievi sussulti fibrillari, localizzati ora ai muscoli del collo, ora a quelli degli arti superiori. Questi infermi inoltre erano

sitofobi da qualche giorno e da qualche giorno pure presentavano un rialzo della temperatura che oscillava dai 38° ai 39°.

In tutti questi casi, dopo alcune iniezioni di siero anti-aspergillare proveniente da una capra e da un cavallo immunizzati, si ebbero notevoli miglioramenti.

L' eritema cutaneo presentò costantemente una rapida e intensa desquamazione, che si è spesso estesa anche alle località limitrofe all' eritema, le quali prima apparentemente sembravano d' aspetto normale. Lo sfaldamento dell' eritema poi avvenne in grandi falde, lasciando a nudo il derma. La temperatura, tanto nei casi con ipotermia, quanto in quelli con ipertermia, ritornò normale e invariata tra il 2° o 3° giorno. Nei casi di ipertermia fu poi sorprendente il rapido e costante abbassamento della temperatura che avveniva poche ore dopo l' iniezione del siero. I tre casi con sitofobia, già dopo 24 ore circa dalla prima iniezione si nutrivano spontaneamente.

I disturbi intestinali migliorarono di solito più lentamente. Ad ogni modo però sono completamente scomparsi in tutti i casi in un periodo da 3 a 7 giorni.

I disturbi psichici acuti furono pure lenti a risentire l' effetto delle iniezioni, ma ad ogni modo anche questi migliorarono e scomparvero in media dal 1° al 10° giorno. In un caso però alla cessazione dei fenomeni psichici acuti seguì uno stato di depressione e confusione psichica, che persiste tuttora.

Il settimo caso curato col siero anti-aspergillare riguardava una donna entrata ai primi di Maggio scorso con tutti i caratteri di un tifo pellagroso grave. L' inferma morì 16 giorni dopo il suo ingresso, e all' autopsia, da me riassunta nella prima parte di questo lavoro, presentava i caratteri tipici di una pleurite e di una meningite acuta aspergillare.

Nonostante l' esito letale di quest' inferma, il suo modo di reagire alle iniezioni fu assai interessante, essendo apparse evidenti anche in questo caso le proprietà attive del siero di un secondo cavallo immunizzato coll' *aspergillus fumigatus*.

All' inferma furono praticate in tutto 12 iniezioni di siero di 10 cmc. l' una, e 6-7 ore dopo ciascuna iniezione, specialmente nei primi 10 giorni, si osservò quasi costantemente una rapida e accentuata remissione dei fenomeni morbosi fisici e psichici. L' inferma da agitata diventava calma, la temperatura da 38°-39° discendeva rapidamente a 37°-37°5 e tanto

l' esagerato tono muscolare, quanto gli intensi sussulti muscolari scomparivano.

Questo miglioramento è però sempre stato transitorio e di breve durata; giacchè l' inferma dopo 15-20 ore ritornava nelle condizioni di prima.

Negli ultimi 4 giorni poi le iniezioni del siero non dimostrarono più alcuna azione attiva nè sullo stato fisico, nè sullo stato psichico dell' inferma.

Tanto dai risultati avuti sugli animali, quanto da quelli rilevati sull' uomo, noi possiamo dunque fin d' ora ritenere che il siero di sangue di capre e di cavalli immunizzati contro l' *aspergillus fumigatus* può possedere un' azione curativa specifica. Vedremo però a suo tempo quali sono le condizioni speciali nelle quali gli animali immunizzati possono dare un siero attivo; e vedremo, dopo altri tentativi di prova sull' uomo, se sarà realmente consigliabile un' applicazione pratica di questa siero-terapia nella pellagra.

## Cap. VI. — *Considerazioni epicritiche.* *Aspergillosi umana comune e aspergillosi dei pellagrosi.* *Proprietà patogene delle spore aspergillari.*

Dopo quanto ho esposto nei varii capitoli di questa mia Memoria, non credo possibile mettere in dubbio la grande importanza che hanno l'*aspergillus fumigatus* e l'*aspergillus flavescens* nella patogenesi della pellagra.

Abbiamo visto anzitutto l' immensa diffusione di questi due parassiti negli ambienti anti-igienici e il loro enorme sviluppo sul *maiz* e sulla polenta in determinate stagioni dell' anno.

Abbiamo dimostrato come l' alternarsi delle fasi di recrudescenza della pellagra coincida col ciclo biologico di questi funghi, e di conseguenza col grado massimo della loro virulenza.

Il periodo di recrudescenza massima (primaverile) corrisponde allo sviluppo massimo dell' *aspergillus fumigatus*, e il periodo di recrudescenza minima (autunnale) corrisponde allo sviluppo massimo dell'*aspergillus flavescens*, meno patogeno del primo.

L'alternarsi delle fasi di recrudescenza massima e minima dell'endemia pellagrosa, corrisponde pure alla prevalente e rispettiva presenza del primo e del secondo aspergillo, nel contenuto intestinale dei pellagrosi e dei gallinacei nutriti di *maiz* avariato.

Al periodo di recrudescenza massima dell'endemia corrisponde infine un' infezione nell'uomo, determinata prevalentemente dall' *aspergillus fumigatus*; mentre al periodo di recrudescenza minima corrisponde una infezione determinata prevalentemente dall' *aspergillus flavescens*.

Le ricerche sperimentali dimostrarono inoltre chiaramente come questi ifomiceti entrando nell' organismo, specialmente sotto forma di spore, per l' ingestione di cibi infetti, possono dar luogo a dei gravi fenomeni analoghi a quelli che vanno sotto il nome d' intossicamento maidico.

Quale importanza possa avere l' alimentazione maidica nel determinare l' entrata dei germi nell' organismo e nel medesimo tempo nel produrre un'infezione specifica l' abbiamo dimostrato colle ricerche dei parassiti sulla polenta e sul *maiz*, e colle esperienze fatte coll' alimentazione di *maiz* infettato artificialmente coi parassiti stessi.

Vediamo ora quale sia il significato patogenetico che si può dare nella pellagra all' infezione aspergillare da me riscontrata nei pellagrosi.

Dovremo noi considerarla in genere nei pellagrosi come un fatto di origine primaria, oppure come un fatto d' origine secondaria? Dovremo noi, cioè, considerare l' aspergillosi nei pellagrosi, come causa prima dei gravi fenomeni caratteristici e della morte degli infermi: oppure dovremo considerarla quale una semplice complicazione della pellagra già in corso?

Nessuno dei dati che ci forniscono le nostre ricerche, sia anatomo-patologiche, sia sperimentali, starebbe a dimostrare che l' infezione aspergillare nel pellagroso possa essere considerata di natura secondaria; ma tutti starebbero invece a dimostrarne la natura primaria. Ricorderò in proposito come la gravità, i caratteri nelle forme acute o croniche dei fenomeni d' intossicamento maidico nell' uomo, abbiano sempre presentato un intimo rapporto colla sede, colla natura e col carattere delle lesioni anatomo-patologiche. In quanto alla sede delle lesioni dirò solo della meningite specifica, quasi costante

nelle forme acute e per se stessa già sufficiente a spiegare in gran parte i fenomeni e il decorso della malattia.

Il potere patogeno del parassita, stesso riscontrato all'autopsia quale causa determinante delle lesioni anatomiche è quasi sempre stato in rapporto colla gravità dei fenomeni clinici.

Nelle forme acute, nel tifo pellagroso, si isolò di solito l' *aspergillus fumigatus*. Nei pochi casi di pellagra cronica nei quali pure si isolò l' *aspergillus fumigatus*, la morte era però avvenuta costantemente in periodi dell' anno che corrisponderebbero a uno stato di virulenza minima del parassita; giacchè questa, come vedemmo, può in natura notevolmente attenuarsi dalla primavera all' inverno successivo.

Alle forme di pellagra con fenomeni sub-acuti o cronici, che sono le più frequenti, corrisponderebbe invece di solito un' infezione da *aspergillus flavescens*, che ha un ciclo biologico più lungo del *fumigatus*, trovando queste condizioni di temperatura favorevoli pel suo sviluppo in parecchi periodi dell' anno, come già dimostrai.

Se l' infezione aspergillare nei pellagrosi non fosse che secondaria, non si spiegherebbe questa esatta coincidenza e tutti questi rapporti tra il potere patogeno del parassita, della sua fase di sviluppo e i fenomeni clinici della malattia.

Forse nelle forme di marasma pellagroso nelle quali noi abbiamo potuto riscontrare un'infezione aspergillare, si potrebbe pensare a un processo morboso secondario; ma a tale proposito debbo notare che l' aspergillosi fin qui non fu mai riscontrata in tutte quelle altre forme marasmatiche non pellagrose, che appunto formano il maggiore contingente del materiale di autopsia nei Manicomî.

Solo nei casi in cui unitamente all' aspergillo si isolò il bacillo di Koch si potrebbe con una certa probabilità pensare a un fatto secondario; ma i casi di questo genere furono così scarsi tra i nostri pellagrosi, che noi non possiamo trarre da essi alcun giudizio d' indole generale.

Quand' anche però l' infezione aspergillare nei pellagrosi fosse di natura secondaria, ciò che io non posso ammettere in modo assoluto, il fatto messo in evidenza dalle mie ricerche non diminuirebbe, credo, affatto della sua importanza per la patogenesi della pellagra; giacchè la sua frequenza è tale da costituire la regola e non l' eccezione, e da meritare perciò sempre la nostra considerazione.

Ci rimane infine da trattare un' altra questione la quale pure può dar luogo a serie discussioni sull' origine primitiva o secondaria dell'infezione aspergillare polmonare nella pellagra e sul valore patogenetico che questa infezione può avere nella pellagra stessa. Voglio dire della natura e decorso clinico che presenterebbe l' aspergillosi specialmente polmonare nei pellagrosi, non che dei caratteri delle sue lesioni anatomiche che tanto si differenziano da quelli dell' aspergillosi polmonare comunemente descritta dagli autori nell' uomo non affetto da pellagra.

La letteratura sull' aspergillosi dell' apparato respiratorio dell' uomo comincia coi reperti di Bennett (25) e di Rayer (26). Il primo nel 1842 descrisse delle muffe negli sputi e nelle caverne polmonari d' un tubercolotico, e il secondo quasi contemporaneamente descrisse degli ammassi di muffe nella pleura pure di un tubercolotico affetto da pneumotorace. Remak (27), Gaidner (28) e Küchenmeister (29) nel 1845 riconfermavano il riscontro di muffe in casi pure di altre lesioni polmonari primitive; ma nessuno poteva classificare il fungo.

Sluyter (30) nel 1847, in un caso di pneumomicosi, scrisse di aver isolato un *mucor*; ma poco dopo Virchow, analizzando meglio il reperto, faceva rimarcare che si aveva a che fare con un aspergillo.

Virchow (31) stesso poi nel 1856 riscontrò l' *aspergillus fumigatus* nei polmoni di quattro individui, dei quali uno era morto di cancro allo stomaco, uno di dissenteria e due di tubercolosi polmonare.

Seguono poi i casi di Friedreich (32), Dusch e Pagenstecher (33), Cohnheim (34), Fürbringer (35), Rother (36), Weichselbaum (37), Herterich (38), Lichtheim (39), Falkenheim (40), Osler (41), Popoff (42) e Wheaton (43) che pure nell' apparato respiratorio di individui già affetti da altre malattie riscontrarono dei funghi, di solito degli aspergilli, che dal complesso delle descrizioni date dai singoli autori sembrerebbe trattarsi quasi sempre dell'*aspergillus fumigatus*.

Dieulafoy, Chantemesse e Widal (43) nel 1890 descrissero in tre individui incaricati di nutrire i piccioni per la bocca *(gaveurs de pigeons)* una malattia cronica polmonare determinata dalla presenza dell' *aspergillus fumigatus* nelle

vie respiratorie, e che denominarono col nome di aspergillosi pseudo-tubercolare, per la sua analogia clinica colla tubercolosi bacillare. Questi autori furono i primi che dimostrarono chiaramente che si può avere anche un'aspergillosi polmonare primitiva.

Potain (45), Rénon (46), Rubert Boyce (47), Kohn (48), Thoma (49), Ernst (50), Gaucher e Sergent (51), Max Podack (52), Herla (53), Arkle e Hinds (54), Obici (4), ecc. confermarono in seguito in quasi tutti i loro casi l'aspergillosi delle vie respiratorie d'origine primitiva, determinata dall' *aspergillus fumigatus.*

L'aspergillosi primitiva delle vie respiratorie si presenta con sintomi diversi, che nel loro complesso hanno molta analogia con quelli della tubercolosi polmonare.

Gli infermi presentano delle piccole emottisi, dimagrano, hanno tosse con espettorazione spumosa, che diventa poi purulenta e striata di sangue. Hanno i fenomeni obiettivi d'una bronchite accompagnata a lievi aumenti di temperatura serale e non di raro presentano anche delle manifestazioni pleuriche da uno o d'ambo i lati.

L'aspergillosi polmonare comune nell'uomo però non ha un decorso fatalmente progressivo, ma dopo un certo tempo la malattia si arresta e s'avvia verso la guarigione, che può avvenire in tre, sei e più anni.

I casi di aspergillosi primitiva terminati colla morte sono rarissimi, e pare anche che la morte spesso avvenga solo per complicazioni d'una tubercolosi bacillare.

Le lesioni polmonari nell'aspergillosi secondaria variano colla natura delle lesioni primitive e non hanno, specialmente per noi, alcuna importanza. Le lesioni dell'aspergillosi primitiva, che a noi offrirebbero un interesse speciale, sono ancora poco conosciute; prima perchè sono rari i casi di aspergillosi polmonare primitiva, e poi perchè ancora si discute se quelli fin ora descritti dagli autori sieno realmente casi di aspergillosi primitiva.

Ad ogni modo, stando ai casi di aspergillosi primitiva seguita da morte descritti da Rénon, e a quelli descritti pure come tali da Weichselbaum, da Arkle Hinds, da Rubert Boyce e da Kohn, le lesioni polmonari sarebbero di carattere diverso da caso a caso. Ora si tratterebbe di

uno stato enfisematoso unito a piccole e molteplici cavità determinate da dilatazione e ispessimento degli alveoli, che presenterebbero un' infiltrazione cellulare mista con abbondanti filamenti del fungo, ora invece le lesioni sarebbero date da dilatazioni bronchiali e da focolai di pseudo-epatizzazione del parenchima infarcito di elementi filamentosi del parassita, frammisti a focolai di vera epatizzazione rossa.

In questo caso specialmente sarebbe poi anche frequente la presenza di numerosi e piccoli noduli a forma tubercolare, ora caseosi, ora invece rappresentati da tessuto sclerotico.

Il breve cenno della storia, del quadro clinico e delle lesioni anatomiche dell' aspergillosi polmonare comune (pseudo-tubercolosi) dell' uomo, che io ho qui cercato di riassumere, fondandomi su quanto hanno esposto i diversi autori che si sono occupati dell'argomento, basta credo per farci un' idea esatta della diversità enorme tra essa e l' infezione aspergillare che si osserva nei pellagrosi.

La diversità è così rilevante, sia nei fenomeni clinici, sia nel decorso ed esito della malattia, sia nel carattere delle lesioni anatomiche, da costituire due affezioni affatto diverse. La localizzazione è pure diversa nei pellagrosi, nei quali è evidente la preponderanza nelle sierose, specialmente nella pleura. Anche l' agente etiologico che nell' aspergillosi pseudo-tubercolare pare sia rappresentato quasi costantemente dal solo *aspergillus fumigatus,* nell' aspergillosi dell' apparato respiratorio e delle sierose dei pellagrosi a seconda dei periodi dell'anno, è rappresentato ora dall' *aspergillus fumigatus,* ora dall' *aspergillus flavescens,* l' uno e l' altro quasi sempre in colture pure.

È certo però che quest' ultimo fatto pel momento non può avere che un' importanza secondaria; giacchè, come abbiamo visto dalle nostre ricerche sperimentali, le quali confermerebbero in gran parte quelle degli altri autori, e specialmente quelle di Ribbert (55) che studiò contemporaneamente gli effetti patogeni dell' *aspergillus fumigatus* e dell' *aspergillus flavescens,* i caratteri biologici dell' uno sono a un dipresso identici a quelli dell' altro.

Ciò che invece più ci interessa pel momento è la diversità, tra i fenomeni che caratterizzano l' infezione aspergillare pellagrosa e quelli che caratterizzano l' infezione aspergillare

comune. La diversità, ripeto, è così enorme, che giustifica come possa sorgere il dubbio che l' aspergillosi nel decorso della pellagra possa essere un semplice fatto secondario.

Prima però di riprendere la questione sul valore patogenetico che può avere l' infezione aspergillare nella pellagra, vediamo anzi tutto come avviene la morte degli animali che muoiono d' aspergillosi in genere. Avviene la morte in questi casi come nelle malattie microbiche, per avvelenamento di tossine prodotte dal parassita, oppure avviene in modo diverso?

Questa è la domanda che già si fece Kotliar (2), il quale, basandosi sul fatto che l' aspergillosi non produce tossine nei mezzi di coltura, ammise che la causa immediata della morte degli animali fosse sempre dovuta all' asfissia che il fungo determina nei tessuti. Il micelio, che di solito s' infiltra abbondante nei diversi visceri, e che pel suo sviluppo ha bisogno di abbondante ossigeno, impegnerebbe una specie di lotta vitale coll' organismo animale.

Rénon (56), Blanchard (57) e con loro unanimi gli altri autori, negando sempre come Kotliar, che la morte degli animali affetti da aspergillosi possa essere determinata da tossine elaborate nell' organismo, attribuiscono invece la morte a un fatto puramente meccanico, ad un trauma esercitato dai micelî sui tessuti. Gli aspergilli, come tutti i funghi parassiti, determinerebbero la morte degli animali attaccandone direttamente gli elementi anatomici, e opponendosi così alla loro funzione fisiologica integrale.

Se realmente le cose stessero in questo modo noi non potremmo attribuire all' infezione aspergillare da noi riscontrata nei pellagrosi che un valore molto relativo. Sarebbe impossibile mettere in rapporto l' infezione aspergillare colle ultime manifestazioni morbose della pellagra, e tanto meno colla morte dei pellagrosi, specialmente in quei casi in cui l' infezione si limita alla pleura e al pericardio, come abbiamo visto più volte anche in forme acute e sub-acute.

Se non che il concetto che finora si ha sul modo con cui avviene la morte degli animali infetti da aspergillosi in genere, e, dirò meglio, sulle proprietà patogene degli aspergilli, non credo sia più sostenibile, dopo i risultati delle mie esperienze, rivolte appunto a dimostrare il potere patogeno degli aspergilli in rapporto col *maiz*.

Descrivendo i reperti di quelle mie ricerche sperimentali che ci portarono alla evidente conclusione, che i due aspergilli in discorso aumentano enormemente il loro potere patogeno qualora possano entrare nell' organismo animale unitamente al *maiz* su cui si erano sviluppati, ho più volte insistito sul fatto che i parassiti in questo caso producono la morte degli animali coi fenomeni più gravi ed acuti, senza affatto invaderne i visceri, ma rimanendo invece localizzati alla cariosside maidica. Le cariosside all'autopsia degli animali, anche dei casi in cui la morte era avvenuta in forma sub-acuta o cronica, dopo 6-10-15 e più giorni, presentava costantemente un grado di avarìa a un di presso eguale a quello che presentava prima di essere inoculata nell' animale stesso. Debbo osservare a tale proposito che risultati presso a poco identici si hanno anche inoculando le cariossidi infettate con aspergilli anche in località diverse dell' organismo, p. es. sotto la cute e nelle masse muscolari. Anche in questo modo, per quanto i fenomeni di reazione generale sieno di solito meno acuti e meno accentuati che quando l' inoculazione viene fatta direttamente nel cavo peritoneale, tuttavia noi possiamo ottenere facilmente dei gravi disturbi funzionali, ipertermia, diarrea, ecc., perfino la morte degli animali, e senza che il parassita proliferi.

Risulta quindi dimostrato che gli aspergilli, in determinate condizioni speciali favorevoli, possono realmente anche elaborare nell'organismo animale dei veri prodotti tossici, senza bisogno nè di invadere i visceri vitali, nè tampoco di moltiplicarsi, in modo apprezzabile almeno, nel punto stesso in cui erano localizzati.

È inutile che io qui enumeri tutti i particolari interessanti dei risultati delle mie esperienze, fatte coll'inoculazione diretta delle cariossidi avariate, per dimostrare come i tossici elaborati da questi parassiti sieno in questo caso virulentissimi. Ricorderò solo la morte fulminea degli animali, anche di quelli considerati finora refrattarî all' aspergillosi (cani), la comparsa dei gravi fenomeni generali, la frequente complicazione di auto-infezione d' origine intestinale, determinata sempre dai tossici elaborati da questi ifomiceti, per avere un' idea del grado della loro virulenza.

La morte degli animali avviene dunque certo anche per un vero intossicamento, come pei bacterii; di modo che

non è più possibile negare che la causa immediata della morte dei pellagrosi colpiti da aspergillosi possa essere realmente legata all' aspergillosi stessa.

Che gli aspergilli del resto siano capaci di produrre delle tossine quando entrano nell' organismo animale, è dimostrato anche da molti altri fatti. Anzi tutto rammenterò i gravi disturbi funzionali e le profonde lesioni anatomiche che l' ingestione di *maiz* avariato da aspergilli è capace di produrre nel tubo gastro-intestinale, per quanto il germe nell'intestino non si moltiplichi e rimanga invece allo stato di spora, come è risultato dalle nostre ricerche dei parassiti nei varii organi, compreso l' intestino, eseguite in particolar modo sulle cavie.

Lo stesso dicasi anche della morte di questi animali avvenuta non di raro sotto forma acuta, mentre nessun' altra lesione degna di nota era stata rinvenuta all'autopsia, tranne che un semplice stato di congestione generale, specialmente del polmone, unica sede dei parassiti, rinvenuti pure soltanto allo stato di spore.

A tale proposito riassumo qui brevemente il reperto anatomo-patologico di un caprone morto nel periodo di due settimane in seguito a un' iniezione sottocutanea di un' emulsione di spore di *aspergillus fumigatus*. Il reperto ha una importanza non indifferente, in quanto che riproduce anche, si può dire, esattamente le lesioni più frequenti che si riscontrano nelle forme di pellagra acuta e sub-acuta. Il caso appartiene però al materiale di studio sull' immunizzazione artificiale contro l'aspergillosi e sarà descritto perciò più dettagliatamente in altra occasione. L' animale presentò diarrea seguita da un rapido e forte elevamento di temperatura e la morte avvenne con fenomeni di paralisi spastica generale che durarono per circa 24 ore. All' autopsia si rinvenne uno stato di congestione generale, ma non accentuata. I polmoni invece erano fortemente congesti e presentavano dei focolai emorragici più o meno diffusi.

Poco liquido siero-mucoso e d' aspetto spumoso si rinvenne nei grossi e piccoli bronchi. Le pleure erano congeste e il pericardio parietale presentava una zona quasi circolare e del diametro di circa 5 centim., più fortemente iniettata di tutto il rimanente, ispessita e ricoperta da abbondanti pseudo-

membrane neoformate e di aspetto gelatinoso, perfettamente eguali a quelle che riscontrai più volte nella pleurite e nella pericardite dei pellagrosi. Le colture fatte col liquido di Raulin dimostrarono la presenza dell' ifomiceta esclusivamente nel parenchima polmonare congesto e nell' essudato fibrinoso pericardico.

Nel pericardio poi il fungo apparve più abbondante che nel polmone, almeno stando al numero delle colture positive ottenute.

La morte in questo caso era avvenuta con fenomeni acuti uguali a quelli che si hanno inoculando le cariossidi infette negli animali; era avvenuta quindi per un intossicamento determinato, come in quelli, da veleni elaborati dal parassita nello stesso organismo animale. Questi veleni dovevano essere qui però elaborati certamente solo dalle spore del parassita, perchè anche nei tessuti di questo animale il germe non fu mai riscontrato allo stato di sviluppo completo.

Dopo quanto ho esposto io credo che siamo autorizzati ad ammettere che anche nell' uomo i gravi fenomeni pellagrosi, susseguiti generalmente dalla morte, debbano essere determinati da tossici elaborati da spore di aspergilli; molto più, ripeto, che noi possiamo con queste riprodurre negli animali sperimentalmente anche le stesse lesioni anatomiche che si riscontrano nell' uomo.

Veniamo così a stabilire che anche nell' uomo, come già dimostrai per gli animali, gli aspergilli *fumigatus* e *flavescens* possono esplicare il loro potere patogeno in due modi diversi, dando luogo a due diverse forme morbose.

Nel primo il parassita entrato nell' organismo vi vegeta, si moltiplica e coi suoi ifi invadendo i varî organi vitali dell' animale ne altera direttamente la funzione e determina un processo morboso a decorso lento.

Nel secondo caso il parassita entrato nell' organismo si mantiene allo stato di spora, la quale, elaborando ed emanando dei prodotti tossici virulentissimi, determina un processo morboso più rapido del primo e che ha tutti i caratteri d' un intossicamento.

Nel primo caso le lesioni predominanti, causate localmente dal fungo allo stato di sviluppo completo, sono rappresentate da un processo flogistico a carattere prevalentemente tuberco-

lare; nel secondo invece le lesioni locali causate dalle spore del fungo sono rappresentate da un processo flogistico a carattere costantemente diffuso.

Vediamo ora quali possono essere le circostanze per le quali gli aspergilli, o per meglio dire le spore degli aspergilli entrando nell' organismo animale possono determinare o l' uno o l' altro dei due processi morbosi. Vediamo, cioè, quali sono le cause che possono determinare nell' organismo animale la proliferazione della spora aspergillare.

Già nel capitolo precedente ho fatto rimarcare l' importanza che deve avere nella genesi della pellagra il fatto che gli aspergilli entrando nell' organismo di animali di una stessa specie (cavie) per mezzo di semplici emulsioni, possono dar luogo all' uno o all' altro processo morboso a seconda che sieno stati inoculati direttamente nel cavo peritoneale o invece sieno giunti nell'organismo passando pel tubo intestinale, ivi pervenuti per la via boccale o per la via rettale. Nel primo caso, ripeto qui ancora una volta, abbiamo un' aspergillosi a decorso lento e con lesioni a carattere prevalentemente tubercolare, e nel secondo abbiamo un' aspergillosi a decorso acuto e con lesioni a carattere diffuso, come si ha nel pellagroso.

Ho già pure richiamata l' attenzione sull' analogia che i fenomeni clinici e i reperti anatomo-patologici hanno in questo ultimo caso con quelli che si ottengono inoculando direttamente il parassita colle cariossidi infette nel cavo peritoneale o in altre parti dell' organismo animale (nel tessuto sotto-cutaneo, tra le masse muscolari, ecc.) e in base a questa analogia mettevo fin d' allora in dubbio la possibilità che i fenomeni acuti potessero realmente dipendere da un' esaltazione della virulenza del parassita coltivato sul *maiz*, come a tutta prima poteva sembrare.

Ora, in base ai risultati di nuove esperienze, rivolte a dimostrare nel modo più evidente la proprietà che hanno le spore aspergillari di elaborare e di emanare dei tossici virulentissimi nell' organismo animale, possiamo accertare che il nostro dubbio non era infondato e che i fenomeni acuti determinati coll' inoculazione delle cariossidi infette, devono essere ascritti, almeno nella loro parte essenziale, al fatto che la cariosside viene in questo caso a costituire soltanto una

condizione sfavorevole per la proliferazione del germe nell'organismo animale; come lo deve essere pure quando la spora arriva nell' organismo a traverso il tubo intestinale.

Nel primo caso l' impedita trasformazione delle spore in micelio deve esser determinata da un fatto puramente fisico-meccanico, come risulterà dall' esperienza qui appresso; mentre nel secondo caso potrebbe essere determinata anche da cause fisico-chimiche, che per ora ci sono affatto ignote.

*Proprietà patogene delle spore aspergillari.* Ecco in breve l' esperimento con cui credo di poter dimostrare chiaramente come basti anche una causa fisico-meccanica per mettere la spora nell' impossibilità di germogliare e per determinare di conseguenza un intossicamento dell' animale per emanazione di tossici dalla spora stessa.

In piccoli tubi di vetro della lunghezza di 4 centim. circa e del diametro di 5 mill., sterilizzati e aventi un' estremità chiusa alla lampada e l' altra chiusa con cotone non idrofilo, vennero collocate delle patine recenti di *aspergillus fumigatus*, assai ricche di spore. La quantità di spore che veniva messa in un tubetto era però abbastanza piccola e di solito corrispondeva a un dipresso a quella che poteva essere contenuta in tre o quattro cariossidi di *maiz* artificialmente avariate col detto fungo.

I tubetti così preparati furono 4, e ciascuno venne in seguito introdotto nel cavo peritoneale di 4 cavie adulte e del peso di circa 800 gr. ciascuna.

Gli animali dopo 24 ore presentavano i fenomeni di un intossicamento (ipotermia, pelo arruffato, ecc.) e dopo 48 ore vennero uccisi. Il tubetto si riscontrò sempre libero nel cavo peritoneale, tranne in corrispondenza della estremità chiusa con tappo di cotone.

Questa estremità del tubetto si era in tutti i casi saldamente fissata o alla parete peritoneale o ad un' ansa intestinale ed era circondata da un' ammasso di pseudo-membrane d' aspetto gelatinoso che l' avvolgevano e l' incapsulavano per un tratto di circa un centimetro. Il tessuto che era in diretto contatto con questa estremità presentava una forte iperemia e un notevole ispessimento per un largo tratto. Staccato il tubetto da questo tessuto si rilevava all' esame che dei veri zaffi di

fibrina organizzata e mescolata con ammassi di leucociti si erano infiltrati nello stesso tappo di cotone, il quale chiudeva il tubetto per la lunghezza di circa due centimetri. Era perciò evidente una reazione flogistica determinata dai prodotti tossici emanati dalle spore aspergillari a traverso il tappo di cotone. Notisi poi che il tappo di cotone della lunghezza di circa due centimetri, era ancora asciutto per un bel tratto nella sua parte interna, e le spore senza vegetare erano rimaste nella perfetta condizione di prima; per cui dobbiamo ammettere necessariamente che queste spore rinchiuse nel tubetto abbiano elaborato ed emanato dei tossici, capaci di attraversare il tappo di cotone, senza l' intervento di sostanze liquide, e di produrre così a distanza un vero processo flogistico e un intossicamento generale.

L' esperienza fu ripetuta sopra tre conigli del peso di circa 2000 gr., introducendo nel cavo peritoneale di ciascuno di questi un tubetto preparato nel modo suddescritto e contenente abbondanti dosi di spore aspergillari. Questi animali presentarono un progressivo deperimento, diminuendo circa 100 gr. al giorno in peso, e di essi uno morì alla fine del terzo giorno, e gli altri due vennero uccisi alla fine del quinto e del sesto giorno.

Nel coniglio morto al terzo giorno, all' autopsia si aveva una lieve congestione di tutti gli organi e il tubetto inoculato presentava gli stessi fenomeni già descritti per le cavie, cioè: forte infiltrazione leucocitaria e un ammasso di pseudo-membrane gelatinose che costituivano una specie di capsula all' estremità del tubo chiusa con cotone. Un' ansa intestinale assai congesta era fortemente aderente a questo tessuto neoformato. - I conigli uccisi cinque o sei giorni dopo l' inoculazione presentavano una lieve congestione di tutti gli organi interni e fenomeni d' irritazione locale, intorno al tubo, assai più intensi che nel primo. Tutto il tubo di vetro era avvolto da anse intestinali fissate fra di loro per aderenze fibrinose neoformate e che costituivano una sacca. Questa sacca, della grandezza di circa un ovo di gallina, era piena di ammassi biancastri d' aspetto caseoso, affatto simili a quelli che si osservano intorno alle cariossidi avariate da aspergilli quando sono introdotte nel peritoneo. Il tubetto era completamente avviluppato da questa

grande massa di leucociti, tranne alla sua estremità chiusa con tappo di cotone, la quale era invece avviluppata da un grosso ammasso di pseudo membrane d'aspetto gelatinoso che mandavano dei zaffi congesti entro lo stesso tappo di cotone.

In ambedue questi casi il tappo di cotone imbevuto di essudato nella sua porzione libera, sembrava ancora asciutto nella sua porzione interna per pochi millimetri, e le spore senza aver presentato alcuna modificazione rimanevano sul fondo del tubetto pure perfettamente asciutte.

Per eliminare ogni dubbio che i fenomeni qui descritti fossero prodotti dalla presenza del tubetto di vetro per se stesso, come un semplice corpo straniero nel peritoneo, si fecero esperienze di confronto sopra 2 cavie e 2 conigli immettendo pure nel loro cavo peritoneale un tubetto di vetro sterilizzato e preparato come i primi, ma senza spore aspergillari. Gli animali, non presentarono variazioni in peso e, uccisi dopo 2, 3, 5 e 6 giorni, in nessuno di essi si osservarono i fenomeni di quell' intenso processo flogistico locale determinato dai tubetti contenenti spore aspergillari. Qui invece il tubetto si riscontrò costantemente libero nelle anse intestinali e libero pure, nelle cavie, alla sua estremità chiusa con cotone. Nei due conigli invece, uccisi al quinto e sesto giorno, si notò che il foglietto peritoneale aderiva al tappo di cotone, e presentava localmente un essudato fibrinoso pure organizzato, ma assai scarso, limitato al tappo e che non debordava neppure dall' apertura del tubo. Nessun carattere di un grave processo flogistico si è osservato anche in questi casi.

Le spore aspergillari quindi, introdotte nell' organismo animale anche in modo tale che non possano mettersi in contatto diretto coi tessuti, e in condizioni ancora che non possano germogliare, elaborano ed emanano dei tossici virulentissimi, capaci di agire sui tessuti anche a distanza determinando un processo flogistico locale e un intossicamento generale dell' animale.

Le esperienze si sono ripetute anche colle spore di *aspergillus flavescens* e con quelle di *aspergillus niger*; ma sui risultati di queste ricerche riferirò pure in altra occasione, meritando l' argomento uno studio più completo sotto parecchi punti di vista.

Molto probabilmente la cariosside di *maiz* infetta di aspergilli agisce come il tubetto di vetro, nel determinare i fenomeni acuti negli animali, impedendo cioè meccanicamente la proliferazione delle spore che essa contiene; il che solo può spiegare la morte degli animali avvenuta per intossicamento, mentre il fungo anche nell' interno della cariosside, come dimostrai più volte, non prolifera, ma rimane sempre localizzato allo stesso punto che occupava prima che la cariosside fosse immersa nel peritoneo dell' animale, anche se questa ivi rimane per più giorni di seguito.

Dopo queste esperienze non credo per ora possibile di poter dedurre dai risultati sopra ottenuti inoculando direttamente negli animali le cariossidi infette di aspergilli, che si possa trattare di una esaltazione della virulenza del parassita determinata dal *maiz* per se stesso.

Riassumendo perciò, in base a quanto abbiamo esposto in questo capitolo, noi potremo dire che, mentre l' aspergillosi comune nell' uomo (pseudo-tubercolosi) è determinata dall' aspergillo che allo stato di fungo completo si moltiplica e si diffonde invadendo i vari tessuti colpiti, l' aspergillosi pellagrosa è invece determinata dal parassita che, rimanendo allo stato di spora è capace di elaborare dei prodotti tossici virulentissimi.

## CONCLUSIONI.

Ecco ora le conclusioni generali che in relazione alla patogenesi della pellagra mi credo autorizzato a trarre dai reperti clinici, anatomo-patologici e sperimentali delle mie ricerche esposte in questa memoria:

1. Gli individui che muoiono coi fenomeni caratteristici della pellagra sia di forma acuta, sia di forma sub-acuta, muoiono quasi sempre in seguito a un' infezione aspergillare. Questa infezione, localizzata generalmente al polmone, alla pleura, al pericardio

e alla pia meninge, costituisce la causa determinante degli stessi fenomeni morbosi.

2. Gli agenti patogeni di questa infezione sono rappresentati in modo speciale dall' *aspergillus fumigatus* e dall' *aspergillus flavescens*, i quali di solito agiscono isolatamente e ben di raro si uniscono per dar luogo a una infezione mista.

3. Questi parassiti provengono dall' intestino allo stato di spore, e come tali localizzandosi nei varii organi e tessuti di loro elezione, vi elaborano ed emanano dei tossici virulentissimi, che determinano dei fenomeni di avvelenamento generale, non che dei processi flogistici locali a carattere diffuso.

4. La gravità dei fenomeni morbosi di questa aspergillosi pellagrosa è di solito in rapporto diretto col potere patogeno delle due specie di aspergilli suddetti e collo stato della loro virulenza.

Le epoche in cui questa aspergillosi compare nell' uomo coi fenomeni più caratteristici e più gravi, corrispondono al ciclo di evoluzione biologica annuale dei due aspergilli.

5. L' alimentazione maidica infetta di aspergilli costituisce una concausa diretta dell' aspergillosi, servendo questa come di veicolo pel passaggio dei suddetti parassiti dall' ambiente esterno all' organismo umano, attraverso il tubo intestinale.

6. L' infezione aspergillare del *maiz* e delle sostanze maidiche alimentari è in rapporto diretto colle cattive condizioni igieniche degli ambienti, nei quali dette sostanze vengono preparate e conservate.

*20 Maggio 1902.*

---

## APPENDICE.

Al II. Congresso pellagrologico recentemente tenutosi in Bologna, nella stessa Seduta del 28 Maggio u. s., nella quale io esponeva i principali risultati dei miei studii sulla patogenesi e sulla cura della pellagra, riassunti in questo lavoro, fin d' allora licenziato per la stampa, il Dott. Antonini comunicava alcuni risultati da lui ottenuti nel Manicomio di Bergamo, iniettando siero di sangue di pellagrosi guariti a pellagrosi in atto.

Questo metodo di cura da me pure tentato, ma senza alcun vantaggio, come già dissi al Congresso stesso e come ho esposto nella presente Memoria, nelle mani del Dott. Antonini avrebbe però dato risultati assai interessanti, giacchè con esso si sarebbero guariti dei pellagrosi anche gravissimi.

Un grado diverso d' immunità individuale acquisita dei pellagrosi guariti che fornirono il siero per le mie esperienze e per quelle di Antonini, potrebbe spiegare i risultati diversi ed opposti da noi due ottenuti.

Siccome però i risultati dell' Antonini potrebbero essere dovuti anche a qualche speciale particolarità di tecnica nella applicazione del metodo; così io attendo la pubblicazione del lavoro completo prima di fare degli apprezzamenti in proposito.

Qualunque sia la causa dei risultati dell' Antonini essi meritano certo la nostra considerazione, specialmente per la analogia che presentano con quelli da me ottenuti col siero antiaspergillare, ricavato dagli animali immunizzati, sebbene quelli possano essere spiegati anche colla teoria tossica della pellagra, dalla quale appunto l' Antonini è partito per eseguire queste ricerche.

# RICHIAMI BIBLIOGRAFICI


1. Ceni. Ricerche sul potere riproduttivo e sull'ereditarietà nella pellagra speri mentale. *Riv. sper. di Freniatria*. Vol. XXVII. fas. 1. 1901.
2. Kotliar. Contribution à l' étude de la pseudo-tuberculose aspergillaire. *Ann. de l' Inst. Pasteur*. 1894, p. 479.
3. Rénon. Essais d' immunisation contre la tuberculose aspergillaire. *Soc. de biol* 20 juillet 1895.
4. Obici (A.). Ueber die pathogenen Eigenschaften des Aspergillus Fumigatus. *Ziegler's Beiträge zur patholog. Anat. ecc.* B. 23, 1898, p. 197.
5. Rénon. Recherches clin. et exp. sur la pseudo-tubercul. aspergillaire. *Thèse de Paris*. 1893.
6. Lucet. Études cliniques et expérimentales sur l' aspergillus fumigatus. *Bull. de la Soc. centr. de méd. vét.* 30 juin 1894, p. 387.

   Id. Étude expérimentale et clinique sur l' aspergillus fumigatus. *Id. id.* 30 août 1896.

   Id. De l' aspergillus fumigatus chez les animaux domestiques et dans les oeufs en incubation. Paris, C. Mendel, 1897, p. 62.
7. Grohe. Experimente über die Injection der Pilzsporen von Aspergillus und Penicillium glaucum in dem Blut und die seröse Säcke. Medicinische Verein zu Greifswald, Sitzung von 7 August 1869. *Berl. klin. Wochenschr.* 1870.
8. Lucet. De l' aspergillus fumigatus chez les animaux domestiques ecc., Lav. cit. p. 63.
9. Rénon. Étude sur l' aspergillose chez les animaux et chez l' homme. p. 85. Paris, Masson 1897.
10. Dieulafoy, Chantemesse et Widal. Une pseudotuberculose mycosique. Congres de Berlin, 1890. *Gazz. des hôp.* 1890.
11. Lucet. De l' aspergillus fumigatus ecc. p. 63,
12. Gaucher et Sergent. Un cas de tuberculose aspergillaire simple chez un gaveur de pigeons. *Soc. méd. des hôp.* 6 juillet 1894.
13. Rénon. Étude sur l' aspergillose ecc., Loc. Cit. p. 80.
14. Kaufmann. Infection produite par l' aspergillus glaucus. Soc. des sc. méd. de Lyon, 1882. *Lyon méd.* 1883. t XXXIX, N. 4 e 10.
15. Grawitz. Beiträge zur systematischen Botanik der pflanzlichen Parasiten. *Virchow's Archiv.* 1877, t. LXX.

    Id. Ueber Schimmelvegetationen im thierischen Organismus. *Id. id.* 1880 t. LXXXI.

    Id. Experimentelles zur Infectionsfrage. *Berliner klin Woch.* 1881.
16. Lucet. De l' aspergillus fumigatus ecc. p. 66.
17. Rénon. Aspergillose intestinale. *Soc. de biol.* 11 janvier 1896.

    Id. Étude sur l' aspergillose chez les animaux ecc. p. 83.
18. Vassale. Sull' enterite pellagrosa in rapporto coll' etiologia della pellagra. *Riv. sper. di freniatria*. Vol. XVII. fas. IV. 1894.
19. Lichtheim. Ueber pathogene Schimmelpilze. Die Aspergillus - mycosen. *Berliner klin. Wochenschr.* 1882. p. 129, 147.
20. Rénon. Étude sur l' Aspergillose ecc p. 111.
21. Rénon. Essais d' immunisation contre la tuberculose ecc. Étude sur l' aspergillose ecc. p. 138.
22. Babes. La pathogénie de la pellagra. *Bull. de l' Acad. de Méd.* N. 31. Seance du 31 juillet 1900 e opp. Babes u. Sion, Die Pellagra - *Specielle Phatol. u. Ther. v. Nothnagel.* B. XXIV. H. II., Abt. III.
23. Antonini e Mariani. Sul potere antitossico del siero dei pellagrosi guariti. *Gazz. Med. Italiana.* N. 8, anno LIII, 1902.

24. Di Pietro. Sui veleni di alcune muffe. Contributo all' eziologia della pellagra. *Annali d' Igiene sperimentale*, fasc. I. Anno 1902.
25. Bennett. *Transact. of the Roy. Soc. of Edinburg.* 1842. t. XV. op. 227.
26. Rayer. *Frorieps's Notizen.* 1842.
27. Remak. Diagnost. und pathog. Untersuch. 1845. p. 244.
28. Gaidner. *Edinb. med. Journ.* 1853, p. 472.
29. Küchenmaister. Die in und an dem Körper des lebenden Menschen vorkommenden Parasiten. Leipzig 1855.
30. Sluyter. De organismis corporis animalis parasitis, ac de novo epiphyto in pityriasi versicolore obvio. Diss. Inaug Berolini. 1847, p 14.
31. Virchow. Beiträge zur Lehre von den beim Menschen vorkommenden pflanzlichen Parasite. *Virchow's Archiv.* t. IX. 1856, p. 557.
32. Friedreich. Fall von Pneumomycosis aspergillina. *Virchow's Archiv.* t. X. 1856, p. 510.
33. Dusch u. Pagenstecher. Fall von Pneumomycosis (Aspergillus pulmonum hominum). *Virchow's Archiv.* t. XI. 1857, p 561.
34. Cohnheim. Zwei Fälle von Mycosis der Lungen. *Virchow's Archiv.* t. XIII. 1864. p. 167.
35. Fürbringer. Beobachtungen über Lungenmykose beim Menschen. *Virchow's Archiv.* 1876, t. LXVI.
36. Rother. Ein Fall von geheilter Pneumomycosis aspergillina. *Charité Annalen.* 1877, Jahrg IV.
37. Weichselbaum. Eine Beobachtung von Pneumomycosis aspergillina. *Wien. med. Wochenschr.* 1878, N. 49.
38. Herterich. Ein Fall von Mycosis tracheae. *Aertz. Intelligenzb.* 1880 n. 43, opp. *Virchow's-Hirsch's Jahresb.* 1880, t. II.
39. Lichtheim. Ueber pathog. Schimmelpilze (Aspergillus-Mycosen). *Berliner klin. Wochenschr.* 1882 N. 9 e 10.
Id. Ueber pathogene Mucorineen. *Zeitschr. für klin. Med.* Bd. VII. H. 2.
40. Falkenheim. Ein Fall von Aspergillusmykose der menschlichen Lunge. *Berl. klin. Wochenschr.* 1882, N. 49.
41. Osler. Aspergillus from the lung. *Transact. of the Pathol. Soc. of Philad.* 1887, t. XII e XIII.
42. Popoff. Ein Fall von Mycosis aspergillina nebst einigen Bemerkungen über ähnliche Erkrankungen der Respirationswege. Varsovie 1887.
43. Wheaton. Case primarily of tubercle, in which a fungus (aspergillus) grew in the bronches and lung, simulating actinomycosis. *Transact. of the Pathol. Soc. of London.* 1890, t. XLI.
44. Dieulafoy, Chantemesse et Widal. Comunication au Congrès de Berlin. Août 1890. *Gaz. des Hopit.* 1890, p. 821.
45. Potain. Un cas de tubercolose aspergillaire. *Union méd.* 1891, N. 38, p. 449.
46. Rénon. *Thèse de Paris.* 1893.
Rénon et Sergent. Lésions pulmonaires chez un gaveur de pigeons. *Soc. de biol.* 27 avril 1895.
Rénon. Deux cas familiaux de tuberculose aspergillaire simple chez des peigneurs de chevaux *Soc. de biol.* 26 oct. 1895.
47. Id. Étude sur l' aspergillose ecc. p. 173.
Rubert Boyce. Remarks upon a case of aspergillus pneumomycosis. *The Journal of Pathol. and Bacteriol.* London, october 1892.
48. Kohn. Ein Fall von Pneumomycosis aspergillina. *Deut. med. Woch* 1893, N. 50.
49. Thoma. Lehrbuch der pathologischen Anatomie. Theil. I. 1894.
50. Ernst. Ueber eine Nierenmykose und das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Pilzformen bei Diabetes. *Virchow's Archiv.* 1894, t. CXXXVII.
51. Gaucher et Sergent. Un cas de pseudo-tubercolose aspergillaire simple chez un gaveur de pigeons. *Soc. méd. des hôp.* 6 juillet 1894.
52. Max Podack Zur Kenntniss des Aspergillusmykosen in menschlichen Respirationsapparat. *Virchow's Archiv.* 1895, t. CXXXIX. — *Centralbl. f. allg. Pathol.* VI. 1895.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: **A. TAMBURINI**
VOL. XXVIII. FASC. IV.

Dott. **CARLO CENI**

# L'AZIONE DEL SUCCO GASTRO-ENTERICO SULLE SPORE ASPERGILLARI
# IN RAPPORTO COLLA GENESI DELLA PELLAGRA



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: **A. TAMBURINI**
VOL. XXVIII. FASC. IV.

**Dott. CARLO CENI**

# L'AZIONE DEL SUCCO GASTRO-ENTERICO SULLE SPORE ASPERGILLARI

# IN RAPPORTO COLLA GENESI DELLA PELLAGRA



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.

*Laboratorio anatomo-patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia*

$\left(\frac{612.386}{132.1}\right)$

Scopo di queste mie ricerche fu quello di studiare la causa di un fenomeno altrettanto interessante quanto curioso da me dimostrato nella recente pubblicazione « Gli Aspergilli nell'etiologia e nella patogenesi della pellagra » [1], riguardante il diverso quadro morboso che le spore degli aspergilli *fumigatus* e *flavescens* ingenerano negli animali a seconda che entrano nell'organismo per inoculazione diretta nei varii organi e tessuti, o nei vasi sanguigni, o se invece vi entrano per la via naturale del tubo gastro-enterico.

Nel primo caso queste spore, vegetando nell' organismo animale, dànno luogo all' aspergillosi comune (pseudo-tubercolosi), e la morte avviene lentamente, determinata dal trauma che l' ifomiceto esercita sui tessuti e sugli organi vitali.

Nel secondo caso, invece, come dimostrai a lungo nel lavoro suddetto, le spore aspergillari, giunte nel tubo intestinale per mezzo delle sostanze alimentari, da qui entrano in circolo invadendo i vari organi, e per le loro proprietà tossiche, da me pure dimostrate, determinano la morte dell' animale per un vero processo di intossicamento acuto e sub-acuto, caratterizzato da fenomeni neurotossici speciali.

Nella pellagra, come dimostrai ancora nel lavoro suddetto, la morte susseguita da fenomeni neurotossici acuti o sub-acuti sarebbe quasi sempre determinata dall' azione tossica delle spore aspergillari, le quali entrerebbero appunto nell' organismo per la via gastro-intestinale, in seguito ad una alimentazione infetta a base di *mais*.

La causa di questo modo speciale di comportarsi delle spore aspergillari quando entrano nell' organismo per la via gastro-intestinale, in seguito alla quale esse perdono il loro potere di

[1] Questa *Rivista*, Vol. XXVIII, N. 2. 1902.

germinare e si mantengono allo stato di spora anche quando sono arrivate nei vari tessuti e nei diversi organi non poteva essere ricercata che in un' eventuale azione dei succhi gastro-enterici, intaccante più o meno la vitalità delle spore stesse. Perciò mi proposi senz' altro di sperimentare *in vitro* la proprietà sporicida di questi succhi organici.

Per queste ricerche ricorsi agli infusi delle mucose gastrica ed enterica fatti separatamente. Le mucose venivano preparate raschiando le pareti del tubo gastro-enterico di cani lasciati a digiuno per un giorno, le quali dopo venivano messe a macerare nella stufa a 38°, per 24 ore, in una quantità d' acqua distillata al doppio del loro peso.

L' infuso veniva poi filtrato traverso una candela Chamberland e il liquido ottenuto era infine abbondantemente seminato di spore di *aspergillus fumigatus* e messo quindi nella stufa a 38°.

Per studiare l' azione di questi liquidi sulle spore facevo, con periodi di intervallo di 24 ore, dei trapianti delle spore in essi seminate passandole in tubi contenenti liquido Raulin, che venivano pure messi nella stufa.

Questa esperienza fu ripetuta per tre volte, usufruendo degli organi di tre cani diversi, e per quanto riguarda i risultati ottenuti, dirò anzitutto che negli infusi di mucosa gastrica seminati e poi lasciati a 38° per un periodo di tempo di parecchi giorni, le spore aspergillari in due casi non diedero luogo ad alcun sviluppo, mentre in un caso, dopo tre giorni di incubazione, poterono germogliare e dar luogo a una patina di aspergilli abbastanza ricca di spore. Negli infusi fatti con mucosa enterica, invece, non si ebbe mai in alcun caso il minimo accenno allo sviluppo del parassita. Ciò dimostra fin d' ora chiaramente che il succo gastrico, e specialmente il succo enterico, sono terreni di coltura sfavorevoli per lo sviluppo dell' *aspergillus fumigatus.*

Ecco ora in breve i risultati ottenuti con trapianti degli infusi nel liquido Raulin, fatti, come dissi, per studiare l' azione sporicida dei succhi stessi.

I trapianti dal succo gastrico fatti nel primo e secondo giorno di prova, si svilupparono quasi sempre a un dipresso contemporaneamente alle seminagioni di controllo, eseguite con spore normali nel liquido di Raulin, cioè, si svilupparono dopo circa 24 ore. I trapianti del terzo e quarto giorno, in un caso si

svilupparono ancora dopo 24 ore e in due casi invece non si svilupparono che dopo 48 ore.

Inoltre potei osservare che nei tubi di controllo di solito lo sviluppo del germe fu anche più rigoglioso che nei tubi di prova; per cui dal complesso di questi reperti dobbiamo anche ammettere in termini generali un' azione attenuante, per quanto lieve, del succo gastrico sul potere germinativo delle spore aspergillari.

I trapianti del succo enterico poi, dimostrarono questa proprietà sporicida in modo ancor più accentuato.

Infatti, in tutti tre i casi, anche nei trapianti fatti il primo e secondo giorno si notò sempre un notevole ritardo di sviluppo, non essendo questo apparso che dopo 48 ore, caratterizzato per di più da una scarsa vegetazione; mentre, nei tubi di controllo il parassita già dopo 24 ore presentava sempre un notevole sviluppo. I trapianti fatti nel terzo e nel quarto giorno poi in 2 casi si svilupparono ancora dopo 48 ore; mentre nel terzo caso si svilupparono solo dopo 72 e 96 ore. In quest' ultimo caso poi, si continuò per qualche giorno ancora a fare dei trapianti, ma già quelli eseguiti nel quinto e nel sesto giorno rimasero sempre sterili, come tutti gli altri fatti in seguito, senza traccie di sviluppo dell' ifomiceto.

Il succo enterico, quindi, oltre ad essere un terreno sfavorevole di coltura per l' *asp. fumigatus*, possiede proprietà sporicide ancor più accentuate che il succo gastrico; proprietà che in alcuni casi possono anche essere tali da togliere completamente alle spore la proprietà di germogliare, in un periodo di tempo abbastanza breve, agendo a un di presso come i disinfettanti in genere, come vedremo a suo tempo in una nota speciale sulla resistenza delle spore aspergillari.

Resta ora da studiare quali siano specialmente i principî del succo enterico che hanno un' azione così manifesta sul potere germinativo delle spore aspergillari, e quali sieno le cause delle variazioni individuali, abbastanza rilevanti, che esistono nel grado del potere sporicida dei succhi in discorso; ma questo formerà oggetto di una nota a parte.

Colle ricerche attuali non mi limitai tuttavia allo studio delle proprietà sporicide dei succhi gastro-enterici, eseguite *in vitro*; ma ho voluto ancora provare sperimentalmente sugli animali le proprietà venefiche delle spore aspergillari sottoposte all' azione dei succhi suddetti, e in modo speciale del succo

enterico che aveva presentato in maniera così costante e persuasiva il suo potere sporicida.

A questo fine preparai, nel modo sopra descritto, del succo enterico più abbondante del solito, ricorrendo alla mucosa intestinale di un grosso cane, e nel liquido ottenuto dalla filtrazione dell' infuso, che fu di circa 150 cmc., seminai 80 cariossidi di *mais* infettate con *asp. fumigatus.* Agitato ripetutamente il matracio contenente il tutto, acciocchè fin da principio le cariossidi venissero a trovarsi completamente immerse nel liquido, questo fu messo a digerire nella stufa a 38°, lasciandovelo per 4 giorni. Alla fine d' ognuno di questi giorni si estraevano dal matracio 10 delle cariossidi infette, le quali venivano tosto sottoposte a prolungati e ripetuti lavaggi con acqua sterilizzata e in ultimo finamente triturate in 20 cmc. di altra acqua sterilizzata. Decantando questa densa emulsione ne ottenevo un'altra meno densa, ma ricca di spore, e questa la inoculavo volta per volta nel peritoneo di due cavie adulte, nella dose rispettiva di 5 e di 10 cmc.

Riassumo in breve i risultati di queste quattro esperienze:

1. Le cavie inoculate coll' emulsione di spore ottenute da cariossidi rimaste un giorno solo nel succo enterico, morirono entrambi dopo 7 giorni, e all' autopsia non presentarono null' altro di notevole che tracce di un essudato peritoneale fibrinoso e una congestione notevole di tutti gli organi. Mancarono lesioni di carattere tubercolare anche nel peritoneo.

2. Delle due cavie inoculate con emulsione di spore ottenuta da cariossidi rimaste nel succo enterico per due giorni, quella che ricevette 10 cmc. morì dopo 56 ore; quella che ricevette 5 cmc. morì dopo 5 giorni. — Ambedue presentavano abbondante essudato peritoneale siero-sanguinolento e ricco di fiocchi di fibrina. - In tutti e due i casi poi esistevano noduli grigiastri nel fegato e nella milza e pochi noduli miliari localizzati ad alcune anse intestinali. Emorragie puntiformi esistevano nei reni e nei polmoni.

3. Delle due cavie inoculate con emulsione di spore ottenute da cariossidi rimaste nel succo enterico per tre giorni, quella che ricevette la dose massima morì dopo 46 ore, e quella che ricevette la dose minima morì dopo 3 giorni. - All' autopsia presentavano ambedue abbondante essudato peritoneale siero-sanguinolento, ricco di fiocchi fibrinosi. Noduli abbondanti nel fegato e nella milza. - Essudato pleurico unilaterale, siero sanguinolento nella seconda cavia. Polmoni congesti con emorragie diffuse. Mancavano traccie di peritonite aspergillare pseudo-tubercolare in ambedue i casi.

4. Delle cavie inoculate con emulsione di spore ottenuta da cariossidi rimaste nel succo enterico per quattro giorni, quella che ricevette la dose massima morì in 26 ore, e all'autopsia presentò essudato peritonale siero sanguinolento con pochi fiocchi fibrinosi e forte congestione di tutti gli organi. La cavia che ricevette la dose minima morì dopo 6 giorni, e all'autopsia non presentò che congestione intensa di tutti gli organi. Mancavano assolutamente lesioni a carattere tubercolare nel peritoneo e negli altri organi.

Riassumendo, quindi, noi abbiamo avuto, come risultato delle nostre iniezioni intraperitonali, la morte acuta o subacuta degli animali in rapporto alla dose massima o minima di spore iniettate. Le lesioni anatomo-patologiche rinvenute poi negli animali erano caratterizzate quasi sempre da semplici processi infiammatorj a carattere diffuso (peritonite essudativa). Scarsissime o mancanti assolutamente erano le forme tipiche dei processi nodulari a decorso lento (peritonite pseudo-tubercolare), comunemente descritti dagli autori in seguito a iniezione intraperitonale di spore, e da me più volte controllati nel lavoro sopra citato.

Solo nell' esperienza 2.ª cioè nelle due cavie iniettate con spore rimaste 48 ore sotto l' azione del succo enterico di cane, si ebbero notevoli lesioni caratteristiche della peritonite pseudo-tubercolare; ma anche in questi casi però tali lesioni, come già feci notare, erano sempre limitate in confronto alle lesioni a carattere diffuso.

Per quanto poi i risultati qui ottenuti fossero stati più che sufficienti per dimostrare come le spore aspergillari, subendo l' azione del succo enterico, possono in seguito dar luogo ad un processo morboso con fenomeni d' intossicamento, e ben diverso dal quadro morboso che presentano comunemente, ho voluto tuttavia ancora ripetere un' esperienza di controllo. inoculando nel peritoneo di due cavie 5 a 10 cmc. di un' emulsione fatta nelle stesse proporzioni delle prime, ma ora con spore normali, cioè, provenienti direttamente dalle colture.

Le cavie morirono nel periodo di 10-16 giorni coi soliti caratteri di peritonite aspergillare comune.

Nel prossimo lavoro sulla resistenza delle spore aspergillari vedremo poi come queste sieno sensibili agli agenti esterni, e vedremo anche come bastino perturbamenti minimi del loro stato vitale, spesso non apprezzabili *in vitro* neppure coi mezzi

di coltura più favorevoli, perchè queste spore si possano trovare nelle condizioni di poter determinare nell' animale dei fenomeni d' intossicamento acuto.

Ora, dopo quanto ho detto nel lavoro già più volte citato, sul potere tossico delle spore aspergillari, sui fenomeni d'intossicamento e sul carattere delle lesioni anatomo-patologiche a cui le spore possono dar luogo, non credo necessario d'insistere più oltre per dimostrare che le cavie inoculate con spore sottoposte all'azione del succo enterico morirono per intossicamento dovuto alle spore medesime.

La più bella riprova di questa affermazione l'abbiamo avuta dai reperti ottenuti dalle ricerche microscopiche, eseguite sugli organi e sui tessuti di alcune delle cavie che servirono alla esperienza, e morte con fenomeni d' intossicamento.

Negli organi di una cavia morta in 26 ore (esp. 4) non si riscontrarono traccie di miceli, ma bensì abbondantissime spore disseminate nel peritoneo e nei diversi organi addominali.

Negli organi di altre due cavie, invece, una morta in 46 ore, e l' altra morta in 3 giorni (esp. 3), si rinvennero pure le spore, ma ora miste in alcuni punti a qualche raro micelio. I miceli però erano sempre, ripeto, assai scarsi in ambedue i casi, ed erano limitati a pochi e piccoli noduli nel rene e nel fegato. Essi erano inoltre rappresentati costantemente da forme più o meno degenerate, corte, tozze, più rigonfie del solito, spesso con vacuoli assai poco colorabili.

Le spore riscontrate negli organi di queste due cavie erano invece, come nel primo caso, abbondantissime, disposte generalmente a gruppi isolati e senza miceli, in mezzo ad elementi parenchimali in necrosi e circondate da abbondanti leucociti.

Nelle glandole peritoneali che macroscopicamente apparivano ingrossate, si rinvenne però il maggior numero di spore, le quali erano inglobate in mezzo a tessuto neoformato e a leucociti, spesso unitamente a sporangi del fungo stesso, che si erano conservati, si può dire, ancora intatti [1].

[1] Per la dimostrazione delle spore nei tessuti si ricorse alla safranina che possiede una vera azione colorante elettiva. Per la colorazione dei miceli invece, si ricorse, come di solito, alla tionina fenicata. Una colorazione doppia dei tessuti fatta prima con safranina e poi con tionina, riesce assai dimostrativa, facendo risaltare molto bene le spore in color rosso cupo in un fondo intensamente colorato in bleu.

In un' altra occasione si vedrà meglio l' importanza di questo metodo di colorazione, adottato dal Dott. Besta nel nostro Istituto per mettere in evidenza le spore aspergillari nei tessuti.

Evidentemente i fenomeni di intossicamento sono quindi da attribuirsi in questi casi alle spore rinvenute, le quali, non potendo trasformarsi in elementi miceliari del fungo, agirono come principî tossici.

Concludendo, quindi, noi dovremo ammettere senz' altro che i succhi gastro-enterici, e specialmente quello enterico possano esplicare un' azione diretta sul potere germinativo delle spore aspergillari, e possano così indirettamente agire nel cambiare il quadro morboso a cui esse dànno normalmente luogo quando entrano nell'organismo di un animale.

Queste spore intaccate dai succhi suddetti nella loro potenzialità germinativa, però, conservando le loro proprietà tossiche più o meno a lungo, possono determinare un vero intossicamento, invece di dar luogo ai fenomeni dell' aspergillosi comune.

Queste conclusioni sarebbero poi la piena conferma dei risultati ottenuti pure nelle cavie mediante l' alimentazione con *mais* infetto di *aspergillus fumigatus*, già esposti nel mio lavoro, e spiegherebbero come, nell' uomo pellagroso, le spore entrando nell' organismo per la via gastro-intestinale, possano in seguito passare nel circolo, localizzarsi nei varî tessuti ed organi, ed, ivi rimanendo tali, determinare i noti fenomeni di intossicamento, che vanno comunemente sotto il nome di fenomeni di intossicamento maidico.

Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

PROF. A. TAMBURINI

IN UNIONE AI PROF.RI

C. GOLGI, E. MORSELLI, A. TAMASSIA, E. TANZI.



La **Rivista** si pubblica in **fascicoli trimestrali.**

PREZZO DI ASSOCIAZIONE

Per l'Italia **L. 20** Per l'Estero **L. 24.**

Un fascicolo separato costa **L. 5,00.**

Le domande di associazione devonsi dirigere alla *REDAZIONE DELLA RIVISTA DI FRENIATRIA, PRESSO L'ISTITUTO PSICHIATRICO, S. MAURIZIO, REGGIO-EMILIA.*

S' intende continuata l'associazione per l'anno venturo, quando non è disdetta un mese innanzi alla fine dell'anno.

Di ogni pubblicazione scientifica interessante il giornale, di cui sia inviata copia alla Redazione, sarà dato annunzio nel bollettino bibliografico.

I reclami per fascicoli mancanti debbono esser fatti entro un trimestre.

La Rivista accorda in dono agli autori 50 copie dei loro scritti; per le copie in più si metterà a loro carico la sola spesa di tiratura e carta.

Ai Librai si accorda lo sconto del 10 per cento.

L'associazione nei paesi esteri, che hanno aderito all' accordo postale di Vienna del 1892, può esser fatta anche presso i rispettivi Uffici postali e in tal caso il prezzo annuo d'associazione è di **L. 20.**

# Abdruck

aus dem

# CENTRALBLATT

für

# Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie.

Herausgegeben von
**Prof. Dr. E. Ziegler**
in Freiburg i. Br.

Redigiert von
**Prof. Dr. M. B. Schmidt**
in Strassburg i. E.

**XIV. Band. 1903.**

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

# Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie.

Herausgegeben von
**Prof. Dr. E. Ziegler**
in Freiburg i. Br.

Redigiert von
**Prof. Dr. M. B. Schmidt**
in Strassburg i. E.

**Preis für den Jahrgang 24 Mark.**

Das *Centralblatt für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie* erscheint seit dem 1. Januar 1890, und zwar in dem Umfange von mindestens 65 Bogen jährlich. Das Blatt ist gegründet worden, um eine möglichst vollständige Uebersicht der immer gewaltiger anwachsenden Arbeit auf dem Gebiete der wissenschaftlichen Medizin, insbesondere jenes Teils derselben, welcher in das Bereich der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie gehört, zu geben.

Es fehlte bisher ein Organ, welches alles Wissenswerte aus dem Gebiete der allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie ohne Rücksicht, ob dasselbe augenblicklich gerade Gegenstand lebhafter Erörterung ist, zusammenstellt und auf diese Weise ein Werk bildet, das ein vollständiges Bild der wissenschaftlichen Forschung bietet. Es war dabei, trotz der gleichmässigen Berücksichtigung aller Arbeitsgebiete, geboten, in der Gruppierung des Materials und in der Art der Berichterstattung auf die besondere Arbeitsrichtung einzelner Zeitabschnitte besondere Rücksicht zu nehmen und Fragen, welchen sich eine grosse Zahl von Forschern in einer gegebenen Zeit zuwendet, durch zusammenfassende Referate ins richtige Licht zu rücken. Ferner musste auch die Möglichkeit gegeben sein, durch Aufnahme kurzer Originalmitteilungen wichtige neue Beobachtungen rasch zur Kenntnis des ärztlichen Publikums zu bringen.

In welcher Weise das »Centralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie« die ihm zufallende Aufgabe zu lösen sucht, geht aus der nachfolgenden Inhaltsübersicht hervor.

Das Blatt enthält:

1) *Originalmitteilungen und Mitteilungen über neue Untersuchungen.*

2) *Zusammenfassende Uebersichten.* Diese Uebersichten haben den Zweck, von Zeit zu Zeit ein möglichst getreues Bild der historischen Entwickelung unserer Kenntnisse über bestimmte pathologische Vorgänge zu geben und zugleich die in Diskussion stehenden Fragen genau zu präzisieren.

3) *Referate.* Es ist die Aufgabe derselben, den Inhalt aller diesbezüglichen, im In- und Auslande selbständig oder in Zeitschriften erscheinenden Arbeiten allgemein pathologischen oder pathologisch-anatomischen Inhalts in knapper, aber streng wissenschaftlicher Form wiederzugeben, sowie auch diejenigen Veröffentlichungen aus dem Gebiete der gerichtlichen Medizin und Tiermedizin zu berücksichtigen, welche für die pathologische Anatomie und allgemeine Pathologie von Interesse und Wichtigkeit sind. Objektivität ist streng gewahrt, sachliche Kritik jedoch nicht ausgeschlossen. Sämtliche Referate sind mit der Namensunterschrift des Referenten versehen.

4) *Systematisch geordnete Uebersichten* über die neueste allgemein pathologische und pathologisch-anatomische Literatur aller Länder; dieselben geben einen möglichst vollständigen Ueberblick über alle Leistungen der letzten Wochen.

5) *Berichte* über Untersuchungs- und Färbungsmethoden, Instrumente etc.

6) *Berichte* über die in das Gebiet der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie einschlagenden Vorträge und Verhandlungen auf Versammlungen und Kongressen. Ebenso wird über die Sitzungen der grösseren wissenschaftlichen Vereine des In- und Auslandes, soweit sie Fragen der allgemeinen Pathologie und pathologischen Anatomie behandeln, regelmässig berichtet.

Abdruck aus dem
Centralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie.
Herausgegeben von Prof. Dr. E. Ziegler in Freiburg i. B.
Redigiert von Prof. Dr. M. B. Schmidt in Straßburg i. E.
Verlag von Gustav Fischer in Jena.
XIV. Band, No. 12, 1903.






# Ueber die Lokalisation der Aspergillussporen in den Mesenterialdrüsen der Pellagrakranken.

Von Dr. C. Ceni,
Prosektor und Dozent der Neuropathologie.

(Aus dem pathologisch-anatomischen Laboratorium des psychiatrischen Institutes von Reggio Emilia.)

Es ist ungefähr ein Jahr, daß ich die Resultate meiner bakteriologischen Untersuchungen veröffentlichte, welche an den Leichen an Pellagra Verstorbener angestellt waren, um in ihren Organen den pflanzlichen Parasiten „Aspergillus" nachzuweisen. Ich hatte bereits auf dessen Sporen meine Aufmerksamkeit gelenkt wegen ihrer eigenartigen und charakteristischen pathogenen Eigenschaften, die sie befähigen, das Krankheitsbild der Pellagra experimentell hervorzurufen. An 28 Individuen, welche an verschiedenen Formen von Pellagra gestorben waren, konnte ich nachweisen, daß bei 21 Fällen die Resultate positiv waren (1).

In diesen 21 positiven Fällen von Pellagra, welche zur Sektion gekommen waren in der Zeit vom 1. April 1901 bis Mai 1902, hatte ich in der Tat in fast immer reiner Kultur bald den Aspergillus fumigatus, bald den Aspergillus flavescens nachgewiesen. Die Parasiten waren hauptsächlich in den frischen fibrinösen Exsudaten der Pleura, des Perikards und manchmal auch der Meningen zu beobachten gewesen; viel seltener und in geringerer Menge wurden dieselben Parasiten aus der Leber, der Milz und fast niemals aus dem Darminhalt gewonnen.

Die Untersuchungen wurden in der Folgezeit fortgesetzt und bis jetzt

ungefähr 20 neue Fälle studiert, über deren Befunde ausführlicher zu sprechen ich mir für eine besondere Arbeit vorbehalte. Ich begnüge mich damit, hier zu erwähnen, daß auch dieses Mal die Befunde in dem größten Teil der Fälle positiv waren und sich die Zahl der negativen Fälle auf ca. $^1/_3$ beschränkte. Ihrer Natur nach waren die positiven Befunde immer so ziemlich gleich den bereits von mir publizierten, so daß wir im allgemeinen diese neuen Befunde nicht anders denn als Bestätigung der ersten betrachten können. Auch bei diesen neuen Untersuchungen verteilten sich schließlich die positiven und negativen Resultate auf die verschiedenen Formen der akuten oder chronischen Pellagra. Jetzt beabsichtige ich, nur die Aufmerksamkeit besonders auf einen Befund bei diesen neuen Fällen zu lenken, welcher mir kürzlich begegnete, und welcher eine besondere Betrachtung verdient, sowohl wegen der Lokalisation des Parasiten als auch wegen einiger Eigentümlichkeiten desselben.

Es handelt sich um einen Fall von Pellagratyphus bei einer gewissen M. V., Bäuerin aus Ciano (Zocca), 45 Jahre alt, verheiratet, gut genährt und kräftig, welche vor der gegenwärtigen Erkrankung keinerlei Leiden hatte. Sie trat in die Anstalt ein am 28. März 1903 in einem Zustand von schwerer Verwirrtheit und Geisteszerrüttung. Sie hat keine Erytheme an den Händen und bietet bei ihrem Eintritt auch sonst keine bemerkenswerten Erscheinungen außer einer starken Steigerung der Sehnenreflexe. Am folgenden Tage aber ist der Muskeltonus der Kranken sehr gesteigert und ihre Reflexe sind noch heftiger, als am Tage vorher. Die Kranke ist sitophob. Am 3. Tage tritt Muskelrigidität auf, starker Zungentremor, heftige Muskelzuckungen am Halse und den oberen Extremitäten. Diese Erscheinungen verschlimmern sich rasch immer mehr, die Temperatur steigt schnell auf 38—39°, und auf einen Zustand von hartnäckiger Obstipation folgen starke Diarrhöen. Die Kranke verharrt 3 Tage in einem Zustand schwerer spastischer Kontraktur der Gliedmaßen und kontinuierlicher heftiger Muskelzuckungen, welche über den ganzen Körper ausgebreitet sind. Darauf verfällt sie fast plötzlich in Agone unter heftigen Schweißen und stirbt am Morgen des 5. April, also 8 Tage nach ihrem Eintritt.

Bei der Autopsie, welche wenige Stunden nach dem Tode vorgenommen wird, findet man eine starke Blutüberfüllung der Meningen und des Gehirns und wenig seröse Flüssigkeit in den Seitenventrikeln. Die Pleuren zeigen nichts Bemerkenswertes außer einem mäßigen Grad von allgemeiner Hyperämie, und Adhärenzen fehlen vollständig. Die Lungen sind blutreich und zeigen beiderseits einen leichten Grad von akutem Oedem. Das Perikard ist blutreich und enthält wenig gelbliche seröse Flüssigkeit. Das Herz zeigt nichts Bemerkenswertes. Die Leber bietet die Zeichen einer beginnenden Fettdegeneration und Stauung. Die Milz von normaler Größe und Resistenz beim Schneiden und von kupferroter Farbe. An den Nieren die Kapsel abziehbar, ein leichter Grad von Atrophie der Rindensubstanz und allgemeine, aber nicht hochgradige Stauung. Die Darmwand zeigt keine Spur von Atrophie, ist aber intensiv hyperämisch, besonders im Anfangsteil des Dünndarms, in welchem außerdem da und dort kleine hämorrhagische Flecken unter der Mucosa erscheinen. Die Mucosa ist überall geschwellt und mit viskösem gelblichem Schleim bedeckt. Weiter fallen die Mesenterialdrüsen durch ihre intensiv kupferrote Farbe auf und durch die bemerkenswerte Vergrößerung ihres Volumens, indem viele die Größe einer Bohne erreichen. Einige von diesen sind außerdem der Sitz hämorrhagischer Herde.

Mit reichlichem Material, durch Abschaben der verschiedenen Organe

erhalten, wurden bei diesem Falle im ganzen 100 Röhrchen, welche Liq. Raulin enthielten, beschickt, indem man durchschnittlich 10—12 Kulturen pro Organ (Meningen, Gehirn, Pleuren, Lungen, Leber, Milz und Darm) anlegte. Die Mesenterialdrüsen wurden in toto herausgenommen und 1—2 per Röhrchen verteilt.

Alle diese — ich wiederhole, überreich — beschickten und bei 38° im Ofen gehaltenen Röhrchen blieben steril bis zum 5. Tage. Am 6. und 7. Tage der Inkubationszeit zeigten 7 von den Röhrchen, welche mit Mesenterialdrüsen (im ganzen 11 Röhrchen) bedacht waren, deutliche und reichliche Spuren von Entwickelung eines Hyphomyceten, welcher sogleich als Aspergillus fumigatus erkannt wurde, die anderen 4 Tuben, welche auch Mesenterialdrüsen enthielten, blieben hingegen immer steril, nachdem sie 10 Tage im Ofen gelassen waren. Das Gleiche ereignete sich bei allen übrigen mit anderen Organen beschickten Tuben, einbegriffen die mit Darminhalt. Alle diese Tuben wurden in der Folge durch weitere 25 Tage in der Temperatur der Umgebung gehalten, um eine eventuelle Entwickelung von Hyphomyceten zu gestatten, welche sich bei niederer Temperatur vermehren, wie z. B. von Penicillium glaucum. Der Befund blieb trotzdem immer negativ.

Die positiven Resultate wurden also in diesem Falle ausschließlich bei den Mesenterialdrüsen erhalten, auf denen sich der Asp. fumigatus entwickelte. Der Parasit entwickelte sich in allen Röhrchen in Reinkultur und direkt auf dem Drüsengewebe, welches am Boden der Kulturflüssigkeit war, und zwar auf jeder Drüse 2—4 Kolonieen. In jeder Eprouvette aber erlangte der Parasit eine so langsame und so wenig kräftige Entwickelung, daß mehrere Wochen nötig waren, bis er mit seinen Mycelien auf die Oberfläche der Kulturflüssigkeit kommen und hier Sporen bilden konnte. Auch die Sporenbildung war dann langsam und spärlich, während wir wissen, daß dieser Pilz sich bei 38° unter normalen Bedingungen in ungefähr 24 Stunden rasch entwickelt und Sporen bildet.

Die Bedeutung dieser neuen Lokalisation der Aspergillussporen, welche in den Organismus durch die infizierte Nahrung gelangten, ist zu deutlich, als daß ich mich in unnütze Betrachtungen verlieren sollte. Dagegen will ich die Aufmerksamkeit auf die evidente Entkräftung des Parasiten lenken, welche in diesem Falle eine besondere Wertung verdient, da sie nur durch eine schon vorgeschrittene Lebensschwächung der Keimsporen erklärt werden kann, welche während ihres Aufenthaltes im Organismus stattfand, und welche wir von jetzt an der defensiven Wirkung der Organsäfte im allgemeinen werden zuschreiben müssen. Ich erwähne hier besonders die sporizide Wirksamkeit der Magendarmsäfte, welche ich schon nachgewiesen habe (2).

Man kann hier nicht von einer natürlichen Abschwächung der Lebensfähigkeit der Sporen, welche außerhalb des menschlichen Organismus stattgefunden hat, sprechen, weil, wie ich schon bewiesen habe (1), die Sporen in diesem Falle vollständig ihre pathogene Wirkung verlieren. In meiner nächsten Arbeit werde ich außerdem beweisen, daß man hier auch nicht von einer künstlichen Abschwächung der Sporen, welche außerhalb des Organismus durch fremde Einflüsse stattgefunden hat, z. B. durch Einfluß der Wärme beim Kochen der infizierten Nahrungsmittel, sprechen kann. In solchem Falle bewahren die Sporen meistens länger ihre pathogene Wirksamkeit, verlieren aber doch leicht die Eigenschaft, akute Phänomene mit lokaler und allgemeiner Reaktion des Organismus hervorzubringen, welche dagegen bei unserer Patientin deutlich auftraten.

Diese schnell verlaufende Abschwächung der Lebensfähigkeit der Aspergillussporen nun, welche im tierischen Organismus eintritt, verdient hier eine besondere Beachtung, da sie dazu dienen kann, die negativen kulturellen Befunde zu erklären, welche ich manchmal auch in Fällen von akuter Pellagra (Pellagratyphus) beobachtet habe, bei denen es gerade unmöglich ist anzunehmen, daß die pathogenen Sporen schon im Momente des Todes des Kranken aus dem Organismus ausgeschieden sein konnten.

Wie ich schon gelegentlich der sporiziden Wirkung der Magendarmsäfte gezeigt habe, steht die pathogene Wirksamkeit der Sporen nicht immer im Zusammenhang mit ihrem Wachstumsvermögen. Die Aspergillussporen können auch vollständig ihre Lebensfähigkeit verlieren und trotzdem ihre toxische Wirksamkeit behalten; dann versteht man weiter, wieso manchmal auch bei akuter Pellagra, die von Sporen hervorgerufen ist, welche sich seit langer Zeit im menschlichen Organismus vorfinden, diese dann auf dem Seziertische nicht durch kulturelle Untersuchungen nachgewiesen werden können. Sehr wahrscheinlich würde der Befund auch im vorliegenden Fall negativ gewesen sein, wenn der Verlauf der Krankheit nicht so fulminant gewesen wäre, wenn die Abschwächung der Lebenskraft der Sporen einen höheren Grad erreicht gehabt hätte.

Aus alledem ergibt sich also, daß auch in den Fällen von akuter Pellagra, in welchen die kulturelle Prüfung von negativem Resultat begleitet war, wir, abgesehen von der Möglichkeit, daß in solchen Fällen die Aspergillussporen auch der Untersuchung entgehen können, auf Grund dieser Befunde ihre Anwesenheit im Organismus des Pellagrakranken nicht ausschließen können, weil ja die Sporen existieren und überaus giftige Toxine verbreiten können, wenn sie auch vollkommen ihre Lebenskraft, ihre Fähigkeit sich fortzupflanzen, eingebüßt haben, und zwar infolge der Wirkung eben jener Organsäfte, mit denen sie im menschlichen Organismus in Berührung kommen.

Daher werden wir mit Rücksicht auf all das von jetzt an den negativen Resultaten der Züchtung bei den Untersuchungen über Pellagra keine große Bedeutung zumessen können, da sie nicht hinreichen, die Gegenwart von Aspergillussporen in den Organen Pellagrakranker auszuschließen.

1) **Ceni**, Die Aspergilluspilze in der Aetiologie und Pathogenese der Pellagra. Rivista sper. di Freniatria, Vol. XXVIII, F. 1, 1902. — **Ceni** und **Besta**, Ueber die Toxine von Aspergillus fumigatus und A. flavescens und deren Beziehungen zur Pellagra. Centralbl. f. allgemeine Pathologie u. pathologische Anatomie, Bd. 13, 1902. — S. auch Rivista sper. di Freniatria, Vol. XXVIII, F. 4.

2) **Ceni**, Die Wirkung des Magendarmsaftes auf die Aspergillussporen in Beziehung zur Genese der Pellagra. Rivista sper. di Freniatria, Vol. XXVIII, F. 4, 1902.



**Berger,** Dr. Hans, Privatdocent der Universität und Hausarzt der psychiatrischen Klinik zu Jena, **Zur Lehre von der Blutzirkulation in der Schädelhöhle des Menschen, namentlich unter dem Einfluss von Medikamenten.** Experimentelle Untersuchungen. Mit 5 Taeln, 16 Kurven und einer Figur im Text. 1901. Preis: 5 Mark.

**Bericht über die vom Komitee für Krebsforschung am 15. Oktober 1900 erhobene Sammelforschung,** herausgegeben von dem Vorstand **Prof. Dr. E. v. Leyden,** Geh. Med.-Rat, Vorsitzender; **Prof. Dr. Kirchner,** Geh. Ober-Med.-Rat, **Dr. Wutzdorff,** Reg.-Rat im Kaiserl. Gesundheitsamt, stellvertretende Vorsitzende; **Prof. Dr. v. Hansemann,** Schatzmeister; **Prof. Dr. George Meyer,** Generalsekretär. **I. Ergänzungsband** zum „**Klinischen Jahrbuch**". 1902. Preis für Abnehmer des „Klin. Jahrbuchs": 8 Mark, Einzelpreis: 10 Mark.

**Chiari,** Professor Dr. H. in Prag, **Die pathologische Anatomie im 19. Jahrhundert und ihr Einfluss auf die äussere Medizin.** Vortrag gehalten in der ersten allgemeinen Sitzung der 72. Versammlung deutscher Naturforscher und Aerzte zu Aachen am 19. September 1900. Preis: 1 Mark.

**Fink,** Dr. Emanuel, Hamburg, **Das Heufieber und andere Formen des nervösen Schnupfens.** 1902. Preis: 1 Mark 50 Pf.

**Foerster,** Dr. Otfrid, Assistent der psychiatrischen Klinik der Universität Breslau, **Die Physiologie und Pathologie der Coordination.** Eine Analyse der Bewegungsstörungen bei den Erkrankungen des Centralnervensystems und ihre rationelle Therapie. Mit 63 Figuren im Text. 1902. Preis: 7 Mark.

**Kronthal,** Dr. Paul, Berlin, **Von der Nervenzelle und der Zelle im Allgemeinen.** Mit 6 lithographischen Tafeln und 28 Abbildungen im Text. 1902. Preis: 16 Mark.

**Lejars,** Felix, Prof. der mediz. Fakultät zu Paris, Chirurg am Hospital Tenon, Mitglied der Société de Chirurgie, **Technik dringlicher Operationen.** Nach der dritten vermehrten und verbesserten französischen Auflage ins Deutsche übertragen von **Dr. Hans Strehl,** ehem. I. Assistent der königl. chirurg. Universitätsklinik zu Königsberg i. Pr. Mit 751 Figuren, davon 351 nach der Natur gezeichnet von Dr. E. Daleine und 172 Originalphotographieen. 1902. **Preis: brosch. 18 Mark, geb. 20 Mark.**

**Ludloff,** Dr. Karl, Privatdozent, **Zur Pathogenese und Therapie der angeborenen Hüftgelenksluxation.** Mit 14 Tafeln und 152 Abbildungen im Text. 1902. Preis: 14 Mark.

**Maximow,** Dr. A., Kaiserl. russischer Stabsarzt, **Experimentelle Untersuchungen über die Neubildung von Bindegewebe.** Mit 13 Tafeln und 1 Textfigur. 1902. (Fünftes Supplementheft der Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, herausgegeben von Prof. E. Ziegler, Freiburg i. Br.) Preis: 20 Mark, für Abonnenten der Ziegler'schen Beiträge 15 Mark.

**Matzuschita,** Teïsi, Dr. med. et phil., **Bakteriologische Diagnostik.** Zum Gebrauche in den bakteriologischen Laboratorien und zum Selbstunterricht. Für Aerzte, Tierärzte und Botaniker. Mit 17 Abbildungen. 1902. Preis: 15 Mark, geb. 17 Mark.

**Mehnert,** Dr. E., weil. a. o. Professor der Anatomie und Prosektor am Anatomischen Institut zu Halle a. S., **Ueber topographische Altersveränderungen des Atmungsapparates** und ihre mechanischen Verknüpfungen, an der Leiche und am Lebenden untersucht. Mit 3 Tafeln und 29 Figuren im Text. 1901. Preis: 6 Mark.

**Melnikow-Raswedenkow,** N., Privatdozent der K. Univ. Moskau, **Studien über den Echinococcus alveolaris sive multilocularis.** Histologische Untersuchungen. Mit 6 Tafeln und 94 Textfiguren. 1901. (Viertes Supplementheft der Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, herausgegeben von Prof. Dr. E. Ziegler, Freiburg i. Br.) Preis: 16 Mark, für Abnehmer der Beiträge: 12 Mark.

**Metschnikoff,** Elias, Professor am Institut Pasteur Paris, **Immunität bei Infektionskrankheiten.** Einzig autorisierte Uebersetzung von **Dr. Julius Meyer,** Arzt in Charlottenburg. Mit 45 Figuren im Text. Preis: 10 Mark.

Die Medizinische Woche No. 45 vom 10. November 1902:

. . . Das Buch ist nicht nur sehr lesenswert, da es ein ungeheures Material enthält, sondern auch glänzend geschrieben. Die Uebersetzung liest sich tadellos.

**Plehn,** Dr. Albert, Kaiserl. Regierungsarzt in Kamerun, **Die Malaria der afrikanischen Negerbevölkerung, besonders mit Bezug auf die Immunitätsfrage.** Mit 1 lithograph. Tafel. Preis: 2 Mark 50 Pf.

**Pilcz,** Dr. Alex., Assistent der k. k. I. psychiatrischen Universitätsklinik in Wien, **Die periodischen Geistesstörungen.** Eine klinische Studie. Mit 57 Kurven im Text. 1901. Preis: 5 Mark.

**Schaffer,** Dr. Karl, a. o. Prof. der Nervenpathologie a. d. Univ. Budapest, Ordinarius des hauptstädtischen „Elisabeth"-Siechenhauses und der Poliklinik, **Anatomisch-klinische Vorträge aus dem Gebiete der Nervenpathologie. Ueber Tabes und Paralyse.** Mit 5 Tafeln und 63 Textabbildungen. 1901. Preis: 12 Mark.

**Schmidt,** Dr. Paul, **Experimentelle Beiträge zur klinischen Pathologie des Blutes.** Mit 4 lithographischen Tafeln. 1902. Preis: 3 Mark.

**Veröffentlichungen des Komitee's für Krebsforschung,** herausgegeben von dem Vorstand Prof. Dr. E. v. Leyden, Geh. Med.-Rat, Vorsitzender; Prof. Dr. Kirchner, Geh. Ober-Med.-Rat, Dr. Wutzdorff, Reg.-Rat im Kaiserl. Gesundheitsamt, stellvertretender Vorsitzender, Prof. Dr. v. Hansemann, Schatzmeister; Prof. Dr. George Meyer, Generalsekretär. **II. Ergänzungsband zum „Klinischen Jahrbuch".** Preis für Abnehmer des „Klin. Jahrb.": 2 Mark 50 Pf., für den Einzelverkauf: 3 Mark 50 Pf.

**Vogt,** Oskar, **Neurobiologische Arbeiten.** Erste Serie: Beiträge zur Hirnfaserlehre. Erster Band: Atlas vollständig, I. Lieferung des Textes. Inhalt: I. Cécile und Oskar Vogt: Zur Erforschung der Hirnfaserung. Mit 60 Lichtdrucktafeln und 25 Figuren im Text. Text und Atlas. — II. Cécile und Oskar Vogt, Die Markreifung des Kindergehirns während der ersten vier Lebensmonate und ihre methodologische Bedeutung. Mit 115 Tafeln. 1902. **Preis: cart. 80 Mark.**

**Weber,** L. W., Oberarzt und Privatdozent in Göttingen, **Beiträge zur Pathogenese und pathologischen Anatomie der Epilepsie.** Mit 1 Tafel und 1 Figur im Text. 1901. Preis: 4 Mark.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 13909




# Abdruck

aus:

# „Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie“

herausgegeben von

Prof. Prof. Dr. Dr. Aschoff in Marburg, v. Baumgarten in Tübingen, Bendz in Lund, Bollinger in München, Bostroem in Giessen, Chiari in Prag, Eppinger in Graz, Ernst in Zürich, Foà in Turin, Golgi in Pavia, Griffini in Genua, Hauser in Erlangen, Homén in Helsingfors, Klebs in Hannover, Klemensiewicz in Graz, Löwit in Innsbruck, Lustig in Florenz, Marchand in Leipzig, Martinotti in Bologna, Nauwerck in Chemnitz, Neumann in Königsberg i. Pr., Paltauf in Wien, Pertik in Budapest, Podwyssozki in Odessa, Reddingius in Groningen, Ribbert in Marburg, Schottelius in Freiburg i. Br., Schmorl in Dresden, Spronck in Utrecht, Stilling ~~in Lausanne~~, Thoma in Magdeburg-Sudenburg, Tizzoni in Bologna, Weichselbaum in Wien, Ziegler in Freiburg i. B.

redigiert von

**Dr. E. Ziegler,**

Professor der patholog. Anatomie und der allgem. Pathologie in Freiburg i. Br.

**Fünfunddreißigster Band. 1903.**

Verlag von Gustav Fischer in Jena.


LIBRARY

# XVII.

# Le proprietà tossiche dell' Aspergillus fumigatus

## in rapporto colle stagioni dell' anno.

Ricerche del

**Dott. Carlo Ceni,**

Docente in Neuropatologia e Direttore dei Laboratori Scientifici dell' Istituto Psichiatrico di Reggio Emilia.

---

In un precedente lavoro col Dr. Besta ho dimostrato come mediante la digestione prolungata in alcool ed in etere si estragga dalle patine di Aspergillus fumigatus un tossico dotato di proprietà intensamente tetanizzanti e convulsivanti. [1])

Da quelle ricerche, rivolte a stabilire solo i caratteri generali del tossico aspergillare, era risultato che la sostanza attiva sarebbe legata esclusivamente alle spore e in rapporto non alla quantità, ma bensì a speciali condizioni biologiche del germe stesso.

Queste ricerche si sono continuate, sia allo scopo di studiare in modo più dettagliato i caratteri di quei principii tossici, sia allo scopo di meglio precisare le condizioni biologiche del germe che favoriscono la formazione della sostanza tossica.

Dello studio della prima parte fu incaricato il Dr. Besta, il quale, come risulterà da una prossima pubblicazione, riuscì a dimostrare che anche negli Aspergilli, come già abbiamo messo in evidenza pei Penicilli [2]),

---

[1]) Ceni e Besta, Über die Toxine von Aspergillus fumigatus und Aspergillus flavescens und deren Beziehungen zur Pellagra, Centralblatt für allgem. Pathol. und pathol. Anat. Bd. XIII 1902. Vedi anche Rivista sper. di Freniatria Vol. XXVIII 1902.

[2]) Ceni, Sulle proprietà patogene del Penicillum glaucum nell' etiologia della pellagra, Rivista sper. di Freniatria Vol. XXIX fasc. III 1903. Ceni e Besta, I Penicilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra, Rivista sper. di Freniatria Vol. XXIX fasc. IV 1903.

quei principii tossici sono legati non solo alle spore, ma anche ai miceli, sebbene in minori proporzioni.

Qui io mi limito perciò ad esporre i risultati delle nuove ricerche che riguardano la seconda parte della questione, vale a dire l'influenza delle stagioni dell' anno sulle condizioni biologiche del germe, e in modo speciale sui principii tossici da esso elaborati.

A questo scopo, per un periodo di oltre un anno, da varii ambienti ho isolato, di mese in mese, l'Aspergillus fumigatus, coltivandolo in capsule Thindal, su liquido di Raulin, e praticando, come nelle precedenti ricerche, l' estrazione della sostanza tossica. Ora però invece che al metodo lento della prolungata digestione delle patine in alcool o in etere, ricorsi, come già pei Penicilli [1]), all' ebollizione delle patine in alcool a 90 $^0$, prolungata per circa mezz' ora. Evaporato l' alcool, il residuo, come il solito, veniva ripreso con acqua calda e inoculato nel peritoneo di cani, del peso oscillante tra i 5 e i 7 kg.

Di ciascun campione di germe si ottennero due patine, il residuo delle quali venne, volta per volta, ripreso con 40 cmc. di acqua.

Siccome dalle ricerche precedenti era già risultato che il fungo cresciuto alla temperatura ambiente primaverile ed estiva si trova nelle condizioni migliori per la produzione dei tossici, mentre alla temperatura di 38 $^0$—40 $^0$, segnata dagli autori come optimum pel suo sviluppo, nel liquido Raulin presentava troppa produzione di micelio e scarsa invece quella delle spore; così le attuali ricerche per eliminare ogni causa possibile d' errore, furono sempre ripetute sia con patine sviluppate a 38 $^0$ —40 $^0$, sia con patine sviluppate a temperatura ambiente. Nei mesi freddi però, quando la temperatura ambiente non bastava per lo sviluppo del parassita, questo fu coltivato artificialmente anche alla temperatura di 28 $^0$—30 $^0$, cercando così di avere delle condizioni di temperatura ad un dipresso uguali a quelle degli ambienti nelle stagioni calde.

Ommetto la descrizione dei fenomeni presentati dagli animali perché identici a quelli descritti nelle ricerche precedenti.

Ecco ora in breve i risultati ottenuti di mese in mese, per un periodo di tempo, ripeto, di oltre un anno:

Ottobre 1902. Le ricerche si sono praticate nella seconda metà del mese, a temperatura, cioé, piuttosto fredda. Il germe a temperatura ambiente si sviluppa solo lentissimamente, dando dopo 10—12 giorni delle chiazze di micelo bianco, senza formazione di spore. Il germe si coltiva perciò alla stufa, sia alla tenperatura di 28$^0$—30$^0$, sia a quella di 38$^0$—40$^0$.

L' esperienza si ripete con germe isolato da 4 ambienti diversi e che indicherò con numeri ordinali.

a) Patine cresciute a 28$^0$—30$^0$. In 4 - 5 giorni si sono avute delle patine formate da uno strato di micelo sottile, ricchissime di spore, di colore verde scuro.

---

[1]) Lavori citati Rivista sper. di Freniatria Vol. XXIX 1903.

A. fum. 1$^0$ — Risultato negativo. Il cane non ha che un po' di vomito alcuni minuti dopo l' iniezione.

A. fum. 2$^0$ — Risultato identico

A. fum. 3$^0$ " "

A. fum. 4$^0$ " "

b) Patine cresciute a 38$^0$—40$^0$. Anche qui si ebbero in 4—5 giorni delle patine bene sporificate non differenziabili in alcun modo né fra loro, né da quelle ottenute a temperatura di 28$^0$—30$^0$.

A. fum. 1$^0$ — Risultato negativo

A. fum. 2$^0$ " "

A. fum. 3$^0$ " "

A. fum. 4$^0$ " "

Novembre 1902. Il germe si é isolato da 2 ambienti e coltivato sia a 28$^0$—30$^0$ che a 38$^0$—40$^0$. A temperatura ambiente il germe non si sviluppa affatto. In tutti i casi risultato negativo quanto a portere tossico. Patine sempre bene sporificate.

Dicembre 1902. Il germe si é isolato da 3 ambienti. Nessuno sviluppo a temperatura ambiente. Sia a 38$^0$—40$^0$, che a 28$^0$—30$^0$ il risultato é stato negativo.

Gennaio 1903. Si fa l' esperienza con germi isolati da tre ambienti. A temperatura ambiente il germe non si sviluppa.

a) Patine cresciute a 28$^0$—30$^0$.

A. fum. 1$^0$ — Estratto di due patine ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. Iniezione di 20 cmc. Quadro completo che dura per 6 ore circa. L'animale é debole per un paio di giorni, ma sopravvive.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Quadro completo: l'animale muore dopo 12 ore.

A. fum. 2$^0$ — Estratto di due patine ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. Iniezione di 20 cmc. Non ha tremori né sussulti. È evidente uno stato di paraparesi spastica del treno posteriore. Inoltre l'animale, di tratto in tratto, ha degli accessi tetaniformi, ma dopo 6 ore si rimette completamente.

Cane di Kg. 5,400. — Iniez. di 20 cmc. Quadro come il precedente; però é meno evidente lo stato spasmodico del treno posteriore.

A. fum. 3$^0$ — Estratto di due patine ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Tremori e sussulti muscolari di mediocre intensità: poi depressione per 24 ore.

Cane di Kg. 7. Iniez. di 20 cmc. Tremori come il precedente.

b) Patine cresciute a 38$^0$—40$^0$.

A. fum. 1$^0$. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Quadro completo che dura circa 6 ore. Poi l'animale si rimette.

Cane di Kg. 7. Iniez. di 20 cmc. Quadro completo durato circa 10 ore. L' animale presenta per 2 giorni una debolezza spiccata.

A. fum. 2$^0$. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. Iniez. di 20 cmc. Qualche scossa muscolare ed un po' di tremore, cessati dopo 3 ore.

A. fum. 3$^0$. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Un po' di tremore e qualche sussulto, cessati dopo 4 ore circa.

Febbraio 1903. Si esperimenta con germi isolati da 3 ambienti. A temperatura ordinaria non si riesce ancora ad avere delle patine di sviluppo rigoglioso e bene sporificate.

a) Patine cresciute a 28°—30°.

A. fum. 1°. Estratto di due patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 6. Iniez. di 20 cmc. Quadro classico. Morte dopo 10 ore. Notevole in questo caso la diarrea intensa e continua con abbondante catarro.

A. fum. 2°. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Tremori e sussulti muscolari molto intensi: andatura inceppata e rigida: mancano gli accessi convulsivi e tetaniformi. I fatti durano 6 ore: dopo 12 ore l'animale sta bene.

A. fum. 3°. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 6 circa. Iniez. di 20 cmc. Tranne il solito vomito ed un po' di paresi generale non si notano fatti degni di nota.

b) Patine cresciute a 38°—40°.

A. fum. 1°. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 6. Iniez. di 20 cmc. Quadro completo: morte in 6 ore.

A. fum. 2°. Estratto di 2 patine ripreso con 40 cmc.

Cane di Kg. 5. Iniez. di 20 cmc. Quadro lieve senza fenomeni tetaniformi.

A. fum. 3°. Estratto di 2 patine inattivo.

Marzo 1903. A temperatura ambiente il germe cresce ancora stentatamente, avendosi la sporificazione molto scarsa solo dopo 4—5 giorni. Si fa perciò ancora la ricerca della tossicità, solo dei germi cresciuti alla stufa. Il germe viene isolato da 2 ambienti.

a) Patine cresciute a 28°—40°.

A. fum. 1°. Attivissimo. Un cane muore in 6 ore.

A. fum. 2°. Mediocremente attivo. Il cane iniettato come il solito presenta tremori muscolari e sussulti senza fenomeni convulsivi e tetaniformi.

b) Patine cresciute a 38°—40°. Risultati identici ai precedenti.

Aprile 1903. Il germe si sviluppa bene a temperatura ambiente: lo strato di micelo é completo dopo 2 giorni, la sporificazione s' inizia al 3° giorno ed é completa al 7°—8°. Complessivamente si ha perciò un lieve rallentamento nello sviluppo in confronto a quello della stufa. Si fa la ricerca della tossicità sul germe coltivato a temperatura ambiente e sul germe coltivato a 38°—40°. Il germe si isola da 3 ambienti.

a) Patine cresciute a temperatura ambiente.

A. fum. 1°. Attivo: il cane di esperimento presenta il quadro completo, che dura 6 ore circa: ma poi sopravvive.

A. fum. 2°. Attivo: quadro completo che dura circa 10 ore. L'animale sopravvive.

A. fum. 3°. Attivo: quadro completo durato circa 6 ore. L'animale sopravvive.

b) Patine cresciute a 38°—40°.

A. fum. 1°. Scarsa attività. La quantità solita di estratto (20 cmc.) iniettata nel cane non dà fenomeni evidenti: iniettando gli altri 20 cmc. si hanno fenomeni e sussulti muscolari senza accessi tetaniformi.

A. fum. 2°. Attivo: quadro completo che dura per 4 ore circa: resta però nell' animale una spiccata paresi per un giorno circa.

A. fum. 3°. Scarsamente attivo. Solo con 40 cmc. si hanno tremori e sussulti muscolari evidenti.

Maggio 1903. Sviluppo rapido delle patine a temperatura ambiente. Sporificazione che si inizia al $3^0$ giorno ed é completa al $6^0$—$7^0$. Si esperimenta con germe isolato da 3 località.

a) Patine cresciute a temperatura ambiente.

A. fum. $1^0$. Attivo. L'animale iniettato presenta il quadro completo, e muore in poche ore.

A. fum. $2^0$. Idem.

A. fum. $3^0$. Idem.

b) Patine cresciute a temperatura di $38^0$—$40^0$.

L'estratto di nessuno dei tre campioni anche iniettato in quantità doppia del solito produce fenomeni evidenti.

Giugno 1903. Sviluppo rapido del germe a temperatura ambiente. Lo stato di micelo é completo dopo 20 ore: la sporificazione é completa dopo 4—5 giorni. Si sperimenta con germi isolati da 4 località.

a) Patine cresciute a temperatura ambiente.

A. fum. $1^0$. Attivissimo. Quadro completo con morte dell' animale.

A. fum. $2^0$. Idem.

A. fum. $3^0$. Quadro completo: l'animale sopravvive.

A. fum. $4^0$. Quadro completo con morte dell' animale.

b) Patine cresciute a temperatura di $38^0$—$40^0$.

Nessuno dei campioni ha mostrato di possedere anche solo traccia del potere tossico specifico.

Luglio 1903. A temperatura ambiente il germe isolato da 3 locali é sempre attivissimo: a temperatura di $38^0$—$40^0$ sempre inattivo.

Agosto 1903. Germe isolato da 4 ambienti. Sempre attivissimo a temperatura ordinaria: inattivo se coltivato in stufa.

Settembre 1903. Germe isolato da 4 località diverse. Risultati identici ai precedenti, cioé, il germe é sempre attivissimo se coltivato a temperatura ambiente. e inattivo se coltivato a temperatura di $38^0$—$40^0$.

Ottobre 1903. Ai primi del mese ho sperimentato il germe proveniente da due località diverse. A temperatura ambiente si ottengono ancora delle patine discrete, di sviluppo completo al $8^0$—$9^0$ giorno.

a) Patine cresciute a temperatura ambiente. Ambedue i campioni sono abbastanza attivi, ma i tossici nelle dosi usate non producono che fatti transitorii e non la morte dei cani.

b) Patine cresciute a $38^0$—$40^0$. Nessuna produce fenomeni evidenti.

Novembre 1903. Il germe, isolato da due diverse località, a temperatura ambiente si sviluppa solo lentissimamente, dando luogo a delle colonie sparse e formate esclusivamente di micelo, e dopo 12 giorni non si riesce ancora a vedere l'inizio di sporificazione. In stufa, tanto a $28^0$—$30^0$, quanto a $38^0$—$40^0$, il germe dà invece rapido sviluppo a patine sporificate in modo completo dopo 4—5 giorni, che si dimostrano però completamente inattive per tutti e due i campioni.

Verso la fine di questo mese poi ho voluto ripetere l' estrazione dei tossici anche da patine recenti, ottenute con due campioni di germi isolati nei mesi di Maggio e Giugno, e che a quell' epoca appunto si erano dimostrati attivissimi. I risultati però furono anche questa volta negativi, sia per le patine ottenute alla temperatura di $28^0$—$30^0$, sia per quelle ottenute a temperatura di $38^0$—$40^0$.

Due fatti di un valore non indifferente risultano quindi da questa nuova serie di esperienze sulle proprietà dell' Aspergillus Fumigatus di elaborare i principii tossici specifici tetaniformi, estraibili coll' alcool, considerata in rapporto colle diverse stagioni dell' anno.

Anzitutto appare nella maniera più evidente che il parassita, coltivate nel liquido di Raulin, ha una potenzialità di elaborare i principii tossici suddetti diversa ed opposta a seconda delle diverse stagioni dell' anno, tanto se viene fatto sviluppare a temperature costanti che corrispondano al suo optimum di vita (38 $^0$—40 $^0$), quanto se viene fatto sviluppare a temperatura che in determinati periodi dell' anno corrisponde all' optimum per la produzione dei tossici stessi.

Solo nei mesi nei quali anche a temperatura dell' ambiente il parassita si é potuto ben sviluppare dando luogo rapidamente a patine ben sporificate, vale a dire dall' Aprile al Settembre, esso si é presentato delle proprietà tossiche specifiche.

In questo periodo di tempo la prosenza del tossico é dimostrabile anche inoculando direttamente il parassita negli animali. Durante il Maggio Giugno 1903, bastava, p. es., inoculare nel peritoneo di una cavia 6—8 cmc. di un' emulsione fatta con 20 cmc. di acqua e una patina di A. fum. coltivato in un' ordinaria capsula Petri, per ottenere la rapida comparsa dei fenomeni tetanizzanti e la morte dell' animale in 3—5 ore.

L' attività massima del parassita si può dire, dunque, che compare coi primi tepori primaverili e si mantiene così quasi invariata per tutta l'estate; mentre tale proprietà di elaborare i tossici va gradatamente diminuendo coll' avanzarsi dell' autunno, per poi scomparire del tutto nell' inverno.

Questo passaggio graduale dallo stato di attività massima primaverile ed estiva a quello di inattività completa invernale, risulta chiaro dai risultati delle esperienze fatte nell' Ottobre e Novembre dell' anno 1902 e ripetute poi negli stessi mesi nel 1903.

Nel periodo di attività massima però, i tossici sono prodotti quasi esclusivamente quando il parassita viene coltivato a temperatura dell' ambiente, mentre se é coltivato alla temperatura di 38$^0$—40$^0$ il germe rimane sempre pressoché inattivo.

Durante l' autunno inoltrato e massimamente nell' inverno, l' attività del parassita si può dire del tutto spenta, sia se coltivato a 28$^0$—30$^0$, sia se coltivato a 38$^0$—40$^0$. L' inattività assoluta in tutti i campioni del germe isolato l' osservai però solo finora nei mesi di Ottobre, Novembre e Dicembre. Nei mesi di Gennaio, Febbraio e Marzo alcuni campioni del germe, specialmente se coltivati a 28 $^0$—30 $^0$, diedero invece ancora dei prodotti tossici, sebbene quasi sempre assai poco attivi ed incapaci di produrre i fenomeni gravi e caratteristici. Faccio qui notare il fatto curioso ed inesplicabile che in questi tre mesi il parassita diede spesso

luogo a una produzione di tossici, sebbene, ripeto, sempre molto attenuati, anche se sviluppato a 38°—40°; mentre invece nella fase di sua massima attività (primavera ed estate), come dissi più sopra, a questa temperatura rimase sempre inattivo.

Da quanto ho qui esposto ne viene quindi la conclusione, che la proprietà di questo ifomiceto di elaborare i principii tossici in questione non é affatto legata alle condizioni di temperatura che sono necessarie pel suo sviluppo, né tanto meno al terreno su cui si sviluppa; ma é invece legata ad altre condizioni esteriori e precisamente a quel complesso di fenomeni cosmo-tellurici che sono inerenti alle varie stagioni dell' anno.

Le numerose esperienze da me fatte metodicamente in 14 mesi consecutivi e ripetute su varii campioni dello stesso parassita, provenienti da località diverse, mi autorizzano ad affermare questo fatto.

Molto probabilmente si tratta qui di un semplice fenomeno biologico, di una legge fisiologica propria del regno degli esseri ai quali appartengono gli ifomiceti in genere, cioé, propria ai vegetali; la di cui vita é appunto caratterizzata da un periodico alternarsi di fasi di riposo e di fasi di attività (vita latente e vita attiva), in rapporto colle stagioni dell' anno.

Ora sarebbe appunto durante la fase annuale di vita attiva che l' Asp. fumigatus si troverebbe nelle migliori condizioni di elaborare i principii tossici in questione; mentre nella fase di riposo esso perderebbe tale proprietà, se anche coltivato artificialmente a temperature che rappresenterebbero l' optimum pel suo sviluppo.

Gli Aspergilli però non sarebbero i soli parassiti vegetali che vanno soggetti a questa legge biologica. Ricerche in corso sulle diverse varietà di Aspergilli e di Pinicilli mi autorizzano fin d'ora ad affermare che anche tutti questi funghi hanno una proprietà di elaborare dei tossici specifici assai diversa a seconda le diverse stagioni dell' anno. La varietà di Penicillum glaucum che é capace di dare dei principii tossici convulsivanti, (secondo le mie ricerche col Besta [1])), a tale riguardo, si comporterebbe, p. es., a un dipresso come l' Aspergillus fumigatus; ma sui particolari che riguardano questi ifomiceti ritornerò ad esperienze complete.

I principii tossici di cui ho fin qui parlato, cioé quelli di natura convulsivante ed estraibili coll' etere e coll' alcool e in rapporto, ripeto, colle diverse stagioni dell' anno, non sarebbero però i soli elaborati dall' Aspergillus fumigatus; giacché questo parassita, e in modo speciale allo stato di spora, può in qualsiasi epoce dell' anno manifestarsi

---

[1]) Lavori citati.

dotato di propritù tossicho sempre elevatissime, sebbene assai diverse da quelle dei tossici suddetti.

Sarebbero questi dei tossici che finora non si poterono estrarre né coll' etere, né coll' alcool e sembrerebbero legati alla struttura intima del parassita, e particolarmente delle sue spore. Sarebbero tossici di natura non convulsivante; e ad essi si dovrebbero, secondo me, in modo speciale quei gravi fenomeni di reazione flogistica locale, non che quello stato di intossicamento generale che determina rapidamente la morte degli animali, indipendentemente dai fenomeni convulsivanti e tetaniformi, quando le spore aspergillari, anche in piccole quantità, vengano direttamente inoculate nell' organismo.

Così p. es. si spiega come le patine aspergillari o le cariossidi di mais infette mantegono sempre quasi invariato il loro potere patogeno anche dopo l' estrazione dei tossici tetanizzanti mediante la lunga digestione, oppure mediante l' ebollizione in alcool.

Ripetute esperienze eseguite con cariossidi di mais infette con A. fum. coltivato nella stagione invernale e che si presentò privo assolutamente dei principii tossici tetanizzanti, dimostrarono poi che il parassita conservava immutata la sua proprietà tossica di determinare la morte acuta degli animali con gravi fenomeni di reazione locale. Una o due cariossidi inoculate nel peritoneo di cavie bastarono sempre anche in questa stagione, per determinare la morte in 24 ore circa.

L'Aspergillus fumigatus ha dunque la proprietà di elaborare due principii tossici contemporaneamente, gli uni di carattere convulsiante e tetanizzante, estraibili coll' alcool e in rapporto colle stagioni dell' anno; gli altri non convulsivanti né tetanizzanti, non estraibili coll' alcool e legati all' intima struttura del parassita. Su questi ultimi mi riservo di tornare in una prossima nota, essendo stato qui mio unico scopo quello di richiamare l'attenzione sulla proprietà che ha questo ifomiceto di elaborare i principii tossici tetanizzanti solo in determinate stagioni dell' anno, le quali corrispondono precisamente alle fasi di recrudescenza massima dell' endemia pellagrosa, caratterizzata per di più, come sappiamo, specialmente dalle forme acute.

---



Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

# Topographischer Atlas
der
# medizinisch-chirurgischen Diagnostik

von

**Dr. E. Ponfick,**
o. ö. Professor und Direktor des pathologischen Instituts in Breslau.

Preis einer Lieferung von 6 farbigen Tafeln nebst Deckblättern und Text: 12 Mark. Einzelne Blätter 3 Mark.

**Erste Lieferung.** 6 Tafeln und Text. Tafel I: Pneumothorax sinister; II: Endocarditis cum insufficientia valvulae mitralis; III: Carcinoma colloïdes peritoneï; IV: Cirrhosis hepatis; Ascites, Icterus; V: Carcinoma partis pyloricae ventriculi et gland. retroperitonealium; VI: Abscessus otiticus lobi temporalis dextri. Mk. 12,—

**Zweite Lieferung.** 6 Tafeln und Text. Tafel VII: Hepatisatio lobi medii pulmonis dextri; Gastritis chron. prolifera; Hepar adiposum; Ascites levis; VIII: Dextrocardia ex hernia diaphragmatica lat. sin.; IX: Perforatio ulceris rotundi ventriculi; Pneumaskos; Peritonitis seropurulenta; X: Sarkoma coeci et coli ascendentis exulceratum et gangraenosum; XI: Kyphoskoliosis rachitica. Abscessus praevertebralis; Tuberculosis miliaris pulmonum acuta; XII: Adenoma hypophyseos; Hydrocephalus internus. Mk. 12,—

**Dritte Lieferung.** 6 Tafeln und Text. Inhalt: Taf. XIII: 1. Hydrocephalus internus pueri VI mensium. 2. Scoliosis incipiens ex rachitide thoracis. Bronchopneumonia fere confluens lat. utr. 3. Scoliosis rachitica. Dilatatio ventriculi chron. Hepar adiposum; Tumor lienis. XIV. Carcinoma glandularum retroperitonealium post Carc. partis pyloricae ventriculi; Ascites. XV: Endocarditis valvulae mitralis postgonorrhoica; Infarctus haemorrhagicus et embolia arteriae pulm. lobi inf. d.; Sanguis in trachea et ventriculo. XVI. Lordoskoliosis dorsolumbalis sin. (rachitica). Pleuritis sin., Tuberculosis miliaris pulmonum et hepatis. XVII: 1. Haemorrhagia cerebri reïterata, unum diem a. m. in ventriculum later. dextrum perforata. 2. Cystis apoplectica (traum.) XVII annorum lobi front. s. cum sclerosi circumscr. — Pyocephalus recens. XVIII: Dilatatio et hypertrophia cordis d. totius et atrii s. ex insufficientia valvulae mitr. Induratio rubra pulmonum; Synechia vetus pulm. d. Hydrops universalis. Mk. 12,—

**Vierte Lieferung.** 6 Tafeln und Text. Taf. XIX: Gangraena lobi sup. pulmonis d. post Carcinoma annulare. Dislocatio segmenti hepatis constricti; Cholelithiasis. Osteoporosis columnae vertebralis. XX: 1. Sarkoma lobi occipitalis d., prorumpens in cavum intermeningeale. 2. Sarkoma teleangietaticum lobi front., progrediens in corpus striatum et cornu ant. s.; Asymmetria cerebri; Hydrocephalus int. levis. 3. Sarkoma cruris s. fornicis et septi pellucidi, impendens in ventriculum s.; Metastasis in calcare avis d. XXI: Actinomycosis: Synechia tot. pulmonis d. Abscessus et fistulae para- et retropleur., intercost. et musculorum dorsi, perforantes infra scapulum d. Act. diaphragmatis, lobi d. hepatis adip. Degeneratio amyl. renum, gland. supraren., intestini. XXII: Hyperaemia venosa et atrophia incipiens hepatis cum Induratione cyanotica lienis ex insufficientia et stenosi valv. mitralis. Hydropericardium, Hydrothorax imprimis lateris sin., Ascites et Anasakra. XXIII: Aneurysma sacciforme patris ascendentis et arcus aortae. Dilatatio et hypertrophia cordis d. Emphysema pulmonum. Pneumonia recens lobi inf. d. Cyanosis lienis, ventriculi, hepatis. XXIV: Hepatisatio grisea lobi inf. pulmonis sin.; Synechia lienis cyanotici et indurati. Hyperaemia venosa hepatis et ventriculi. Echinococcus hepatis.

Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdr.), Naumburg a. S.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXIX. Fasc. III.

# SULLE PROPRIETÀ PATOGENE DEL *PENICILLUM GLAUCUM* NELL' ETIOLOGIA DELLA PELLAGRA

NOTA PREVENTIVA

DEL

Dott. CARLO CENI
Medico Settore e Docente di Neuropatologia

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1903.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXIX. FASC. III.

Dott. CARLO CENI
Medico Settore e Docente di Neuropatologia

# SULLE PROPRIETÀ PATOGENE
DEL
# *PENICILLUM GLAUCUM*
# NELL' ETIOLOGIA DELLA PELLAGRA



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1903.


LIBRARY

*Laboratorio anatomo-patologico dell' Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*



In una serie di recenti pubblicazioni ho messo in evidenza l'importanza grande che hanno alcune specie di Aspergilli nella pellagra, dimostrando come questi ifomiceti siano capaci di elaborare dai tossici specifici in rapporto, in modo speciale, a determinate stagioni dell' anno, che corrisponderebbero al ciclo di evoluzione biologica del parassita stesso.

Tra questi ifomiceti, l'*Aspergillus fumigatus* sarebbe quello che ha l'importanza maggiore nell' etiologia della pellagra e in modo particolare delle forme acute (tifo pellagroso). I reperti anatomo-patologici, l' isolamento del parassita dai cadaveri di pellagrosi, la proprietà che ha questo fungo di elaborare dei principî tossici potentissimi e caratteristici, capaci di riprodurre nei diversi animali il quadro tipico e completo della pellagra specialmente acuta, e in fine la coincidenza del ciclo biologico col periodo di massima recrudescenza dell' endemia pellagrosa, mi permisero di concludere che la massima parte delle forme di pellagra acuta seguite da esito generalmente letale, sono dovute alle nuove proprietà patogene dell' *Aspergillus fumigatus* che io avevo dimostrato.

Ora continuando i miei studi sull'etiologia della pellagra, in modo speciale delle forme croniche, ho rivolto le mie ricerche sopra un' altra specie di ifomiceti che sul mais avariato si riscontra non meno diffusa degli Aspergilli, vale a dire, sui Penicilli, sui quali già diversi autori, specialmente il Lombroso, già da tempo avevano richiamata l' attenzione dei pellagrologi.

Gosio fu però il primo che studiò in modo particolare il *Penicillum Glaucum* come agente speciale delle alterazioni chimiche nei substrati alimentari, ed ha trovato che questo fungo forma, a spese del mezzo culturale, degli acidi-fenoli, capaci

di produrre, specialmente nel *mus-musculus* dei fatti neuro-muscolari analoghi a quelli che si osservano nelle varie forme di pellagra.

Recentemente il Di-Pietro, mentre ha trovato che la massima parte delle varietà del *Penicillum Glaucum* sono prive di potere patogeno, ne ha isolata una che è fornita di grandissima attività tossica. Egli ha dimostrato inoltre che tale attività è indipendente dal substrato culturale ed è legata esclusivamente alla spora. Dalla spora poi avrebbe, mediante la bollitura in alcool, estratto dei principî tossici, che negli animali in genere determinano dei fenomeni d' intossicamento, caratterizzati specialmente da un esaltamento della eccitabilità neuro-muscolare e da fatti spasmodici.

Ora con nuove ricerche, fatte coll' aiuto del Dott. Besta, ho potuto isolare due varietà di *Penicillum glaucum*, le quali sembrerebbero le più diffuse in natura e sarebbero dotate di proprietà patogene caratteristiche e affatto diverse ed opposte tra di loro. Nell' una il potere patogeno è caratterizzato specialmente da fenomeni depressivi, e nell' altra invece è caratterizzato da fenomeni di eccitamento neuro-muscolare. Quest' ultima varietà corrisponde a quella studiata dal Di-Pietro.

Nel lavoro completo, che sta per essere pubblicato, verranno esposti in modo dettagliato sia i caratteri colturali, sia le esperienze sul potere patogeno di queste due varietà di Penicillo. Qui solo mi permetto di accennare per sommi capi ai fatti principali che riguardano le proprietà patogene di questi parassiti, dalle quali specialmente risulta l' importanza che essi possono avere nell' etiologia della pellagra.

Però, anzitutto, dirò che queste due varietà di Penicillo furono isolate sia dal mais avariato, sia dai diversi ambienti, e che furono riscontrate in proporzioni assai diverse nelle diverse stagioni dell'anno. La prima varietà predominava infatti nei mesi freddi; mentre la seconda predominava nei mesi caldi.

Le numerose esperienze fatte sul potere patogeno di questi due ifomiceti concordarono sempre nel dimostrare che ciascuna varietà è dotata di un potere tossico specifico, il quale si manifesta con caratteri costanti, sia che il germe venga introdotto nell' organismo direttamente per via venosa o peritoneale, sia che vi giunga per la via gastro-enterica, sia che si inoculino i tossici estratti artificialmente dal germe stesso, nel modo che vedremo a suo tempo.

Ecco ora quali sono i fatti principali che caratterizzano e differenziano nettamente tra di loro queste due varietà penicillari dal punto di vista delle loro proprietà patogene.

I.ª Varietà — Qualunque sia il modo con cui la sostanza tossica di questo germe viene introdotta nell' organismo, se la dose è mortale, gli animali (specialmente i cani) entrano sempre e rapidamente in uno stato di abbattimento e depressione generale grave e tipico, che ricorda molto quello che si ha nell'avvelenamento alcoolico acuto. La morte avviene in periodo di tempo assai breve e in grave stato comatoso. Il carattere di questo potere tossico si mantiene costante in tutte le epoche dell' anno.

Troppo manifesta è l' analogia di questi sintomi con quelli che si osservano nelle forme croniche di pellagra, perchè mi fermi a dimostrarla. Ricorderò soltanto come, in rapporto alla natura biologica del parassita, tali forme cliniche si possono avere in qualsiasi stagione dell' anno, l' inverno compreso, durante il quale mancano invece assolutamente le altre forme di pellagra, specialmente la forma acuta.

Dal punto di vista della pellagra però acquistano speciale interesse i fatti che si osservano sottoponendo animali alla nutrizione di mais o di polenta infetta da questo penicillo, essendosi avuta la morte in periodi di tempo sempre breve a un dipresso come coll' *Aspergillus fumigatus*. Se questo fatto prova l' altissimo potere patogeno del germe, debbo però qui notare come in questo caso si tratti di fenomeni di pura intossicazione, dovuti al tossico che si rende libero nel tubo gastro-enterico; giacchè non fu mai possibile, a differenza dell' *Aspergillus fumigatus*, dimostrare il passaggio in circolo delle spore penicillari.

I principii tossici del germe, come vedremo anche per la seconda varietà, non sono legati esclusivamente alle spore, ma bensì anche al micelio, e nel lavoro completo vedremo come siamo per ciò obbligati a modificare il concetto indotto dalle nostre ricerche e da quelle del Di Pietro riguardo agli ifomiceti, che, cioè, alla spora sola spetta un' importanza patogena.

Per quanto riguarda i mezzi nutritivi su cui si sviluppa il germe, possiamo fin d' ora dire che questi non hanno alcun valore nel modificare le proprietà patogene specifiche del germe stesso.

Non voglio con ciò negare che le modificazioni determinate nei mezzi culturali dal ricambio materiale del germe possano avere una importanza patogena; tuttavia credo di poter affermare, in base ai risultati di numerose ricerche fatte in proposito, che le proprietà patogene dei mezzi culturali quando esistono, sono lievi e devono esser considerate come trascurabili di fronte a quelle del germe.

Dirò a tale riguardo che i composti fenolici del Gosio non possono assolutamente essere invocati in questo caso, non avendoli mai potuti dimostrare nè nel germe, nè nel terreno di coltura di questa varietà.

II.ª Varietà — Per ciò che riguarda i caratteri patogeni della seconda varietà, e che, come dissi, consistono specialmente in un aumento dell'eccitabilità neuro-muscolare e in tremori diffusi, possiamo dire che i nostri reperti in complesso corrispondono a quelli riscontrati dal Di Pietro nella sua varietà tossica di *Penicillum;* sebbene vi sieno dei punti di divergenza d' importanza secondaria, sui quali ci fermeremo nel lavoro completo. Anche per questa varietà i caratteri del potere tossico si mantennero costanti in tutte le epoche dell' anno.

Anche qui è risultato, che i principî tossici sono affatto indipendenti dal substrato culturale. Questo germe, contrariamente a quello della prima varietà, ha di frequente presentato la reazione fenolica; ma tra questa e il potere tossico del germe stesso, possiamo dire fin d' ora, non essere mai esistiti dei rapporti, che valessero a far supporre anche lontanamente che la proprietà patogena del fungo possa esser dovuta, come vorrebbe il Gosio, ai principî fenolici elaborati a spese del substrato culturale.

Le proprietà tossiche di questa varietà di penicillo sono, fra gli ifomiceti fin qui studiati, quelle che, per analogia di sintomi, si avvicinano di più a quelle dell' *Aspergillus fumigatus*. Fra queste e quelle esistono ciò non ostante le seguenti diversità sostanziali.

Anzitutto con questa varietà di penicillo, per ottenere il quadro tipico morboso e la morte degli animali, occorrono sempre quantità di germe e di tossico notevolmente superiori a quelle che occorrono per l' *Aspergillus fumigatus*. Mentre con una cariosside di mais infetto con *Aspergillus fumigatus* introdotta nel peritoneo di una cavia si può aver la morte in 24 ore circa, invece occorrono 8 e più cariossidi infette da questa varietà di penicillo per aver la morte di una cavia dello stesso peso e in un periodo di tempo più lungo.

Somministrato questo parassita per via gastro-enterica, per mezzo della nutrizione infetta, al contrario di quanto si ha coll' *Aspergillus fumigatus*, i fenomeni di alterazione alle pareti intestinali o mancano affatto o sono lievissimi, e per di più il passaggio delle sue spore in circolo non si è mai verificato, come abbiamo visto anche per la prima varietà.

Il complesso del quadro clinico determinato da questa seconda varietà di Penicillo presenta pure delle diversità notevoli da quello dell' *Aspergillus fumigatus*, specialmente pel fatto che, mentre nel primo i fenomeni più salienti sono costituiti da tremori diffusi e da un semplice aumento generale nell' eccitabilità neuro-muscolare; invece nel quadro morboso tipico dato dai tossici Aspergillari, l' aumento dell' eccitabilità neuro-muscolare, è seguita da gravi sussulti muscolari diffusi e da veri accessi tetaniformi, sotto i quali l' animale il più spesso soccombe.

Mentre, quindi, anche i fenomeni che si ottengono sperimentalmente colla seconda varietà di penicillo corrisponderebbero a quelli delle forme

di pellagra a decorso lento; invece i fenomeni che si ottengono col-l' *Aspergillus fumigatus* corrisponderebbero a quelli che si hanno nelle forme di pellagra acuta, caratterizzati, cioè da forti scosse muscolari e da vere contratture spasmodiche.

Non è però ch'io intenda con questo di dare un significato esclusivo a tale concetto sulla genesi delle diverse forme cliniche di pellagra, mettendole cioè, in rapporto esclusivo con questa o quest' altra specie di parassita. Se tale idea vale per le forme acute, che devono essere messe in rapporto coll' *Aspergillus fumigatus*, allo stato di sua massima tossicità; invece non può valere per le altre forme cliniche, i di cui fatti morbosi possono corrispondere sperimentalmente a più specie di parassiti. Per cui si dovrà parlare specialmente di prevalenza dell'una o dell'altra specie di parassiti in rapporto al loro predominio nelle diverse epoche dell' anno e al loro grado di tossicità. L' *Aspergillus fumigatus* p. es. che nella primavera dà le forme più gravi; nell' autunno e nell'inverno attenuandosi notevolmente non darà che forme assai miti.

Dovrei ora fermarmi sui particolari anatomo-patologici, a carico specialmente del sistema nervoso centrale, nei quali abbiamo dati differenziali ancor più spiccati del potere patogeno dei Penicilli e degli Aspergilli; ma su ciò mi riserbo di intrattenermi nel lavoro completo, nel quale cercherò di mettere in più chiara evidenza la parte che spetta a queste diverse specie di ifomiceti nell' etiologia delle diverse forme di pellagra.

A me basti con questa nota d'aver potuto affermare che, oltre alle varietà di *Penicillum Glaucum* capace di elaborare dei principî tossici caraterizzati da fenomeni di esaltamento neuro-muscolare, già ammessi anche da altri autori (Gosio e Di Pietro), esiste ancora un' altra varietà di questo fungo e questa assai diffusa in natura, la quale è invece dotata di proprietà patogene diverse ed opposte a quelle della prima, essendo capace di elaborare dei principî tossici caratterizzati esclusivamente da fenomeni di depressione nervosa.

L' importanza che le forme pencillari possono avere nell' etiologia della pellagra viene quindi sempre più messa in evidenza, ed io sono ben lieto d' aver potuto portare anche questo nuovo contributo al concetto dell' etiologia multipla della pellagra, in un momento in cui tanto si fa e si discute su questa malattia.

---



Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

PROF. A. TAMBURINI

IN UNIONE AI PROF.RI

C. GOLGI, E. MORSELLI, A. TAMASSIA, E. TANZI.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXIX. FASC. IV.

# I PENICILLI NELL'ETIOLOGIA E PATOGENESI DELLA PELLAGRA



## RICERCHE SPERIMENTALI

DEI DOTTORI

**CARLO CENI** e **CARLO BESTA**

Medico Settore e doc. di Neuropatologia — Medico interno



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1903.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXIX. FASC. IV.

# PENICILLI NELL'ETIOLOGIA E PATOGENESI DELLA PELLAGRA



## RICERCHE SPERIMENTALI

DEI DOTTORI

CARLO CENI e CARLO BESTA

Medico Settore e doc. di Neuropatologia — Medico interno



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1903.

*Laboratorio anatomo-patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia*

[616. 01]

Nonostante l' importanza che molti autori hanno dato al *Penicillum glaucum* come agente morboso, specialmente nella pellagra, le ricerche sopra il potere patogeno di questo germe non sono numerose.

Le prime, in data di tempo, sono quelle di Grohe [1] e di Block [2] suo allievo, i quali, iniettando emulsioni di spore di *Penicillum glaucum*, videro morire rapidamente gli animali con formazioni nodulari negli organi. Renon ritiene che in tali casi si sia trattato di *Aspergillus fumigatus*. Grawitz [3], invece non ebbe alcun risultato dall' iniezione endovenosa delle spore di *Penicillum glaucum*, ottenuto coi soliti mezzi di coltura, cioè a reazione acida. Avendo però egli, in ricerche successive [4] con trapianti graduali coltivato il Penicillo su mezzi alcalini e ad alte temperature (38°-40°), ne avrebbe avuti notevoli effetti patogeni (noduli pseudo-tubercolari e morte degli animali iniettati).

Koch e Gaffky [5] dimostrarono però che i risultati delle ricerche di Grawitz erano erronei perchè le colture non erano pure: secondo loro le lesioni anatomiche erano invece dovute all' *Aspergillus fumigatus*.

Lichtheim [6] annovera il *Penicillum glaucum* tra le forme certamente non patogene.

In Italia al Penicillo fu rivolta l' attenzione da numerosi osservatori, dopo l' energico impulso che Cesare Lombroso aveva dato agli studi sulla pellagra. In base ai concetti da lui

validamente sostenuti, che la malattia è determinata specialmente dai tossici che si producono nel mais alterato per lo sviluppo in esso di germi di specie svariatissima, se ne studiò in modo speciale la diffusione nel mais alterato e la sua proporzione in confronto degli altri germi parassiti, sia dei congeneri ifomiceti che dei blastomiceti e dei batterii.

Dalle ricerche di Lombroso [7], di Cattaneo [8], di Monti e Tirelli [9], di De Giaxa [10], di Gosio [11], risultò che il Penicillo è la più comune muffa del mais guasto, ed a tutti è sempre riescito di isolarla in grande prevalenza sugli altri ifomiceti.

Ricerche dirette sopra l' importanza sua come agente pellagrogeno, sono invece scarsissime. Lombroso non ottenne alcun fatto che ricordasse la pellagra sia colla nutrizione in ratti ed in uomini, che con iniezioni sottocutanee (a sè stesso) di emulsione di spore.

Gosio [12], prima solo, poi in unione con Ferrati [13], per il primo studiò accuratamente il *Penicillum glaucum* come agente pellagrogeno, rivolgendo in modo speciale l' attenzione alle alterazioni chimiche che il suo sviluppo produceva nei substrati alimentari, ed ha trovato che esso, a spese dell'amido, forma degli acidi-fenoli, che si possono estrarre coll'acool comune o coll'etere (in mezzo acido) e che, iniettati agli animali (il più sensibile sarebbe il *mus musculus*), producono dei fatti neuro-muscolari analoghi a quelli che si osservano nelle varie forme di pellagra. Egli ha anche trovato che non tutte le varietà di Penicillo sono ugualmente capaci di produrre questi acidi-fenoli, che quantitativamente il *maximum* si osserva al momento della sporificazione e che poi rimane a lungo invariato. La neutralizzazione con una base alcalina toglie in gran parte il potere tossico dell' estratto ottenuto. Agli stessi risultati sarebbe arrivato, in seguito, Ferrati [14], che ha continuate le ricerche di Gosio. Per questi autori la tossicità è sempre dovuta ad alterazione del substrato colturale, che, per quanto riguarda la pellagra, sarebbe specifica.

Il lavoro più importante attorno all'argomento che ci occupa ora, è quello del Di Pietro [15], pubblicato l' anno scorso. Egli, mentre ha trovato prive di potere patogeno la massima parte delle varietà di Penicillo glauco, ne ha isolato e coltivato una che si è dimostrata fornita di una grandissima attività tossica. Egli avrebbe dimostrato che tale attività è legata esclusivamente

alla spora: che è indipendente dal substrato colturale: che si manifesta sia somministrando per via gastrica le spore penicillari agli animali, che iniettando loro i tossici estratti dalle spore mediante la bollitura in alcool o coll' etere di petrolio: che i fenomeni sono caratterizzati da esaltamento dell'eccitabilità neuro-muscolare, esagerazione dei riflessi, fatti spasmodici diffusi a tutta la muscolatura, atassia. A tale tossico reagirebbero con intensità progressivamente maggiore, la cavia, il coniglio, il gatto, il cane, l' uomo (sè stesso): sarebbe refrattario il pollo.

Le ricerche di Di Pietro sono certo importanti assai, e sopra di esse noi ritorneremo sovente nel corso del lavoro.

Antonini e Ferrati [16] sono da ultimo ritornati sull' argomento, risostenendo che il potere tossico è legato alle sostanze aromatiche del mezzo colturale e non al germe. I risultati di questi autori non possono però essere da noi tenuti in considerazione per la mancanza di rigoroso criterio scientifico con cui furono condotte le esperienze *.

## Preliminari.

Le nostre ricerche, inspirate dai risultati che uno di noi aveva ottenuto cogli Aspergilli [17], specialmente col *fumigatus*, incominciarono circa un anno e mezzo fa.

Già all' inizio ci si impose un piano assai ampio di lavoro, poichè, essendo oltremodo numerose le varietà di Penicillo glauco, noi ci prefiggemmo di isolarne il maggior numero possibile, di stabilirne i caratteri colturali e di studiarne il potere patogeno.

Solo una parte del cómpito nostro è stata finora eseguita, tuttavia i risultati ci sembrano così interessanti, che noi ci siamo indotti a pubblicarli sin d' ora.

Abbiamo isolato e studiato in modo completo, sia dal punto di vista dei caratteri morfologici e colturali, che dal punto di di vista patologico, due varietà di Penicillo dotate di caratteri nettamente definiti: l' una, che noi chiamiamo provvisoriamente

* Basti a tale proposito dire che questi due AA. fondano le loro conclusioni su esperienze fatte coltivando l' ifomiceto sul mais, dal quale poi hanno preteso di isolarlo completamente col semplice sbattimento in acqua.

« varietà *A* », il cui potere patogeno si manifesta specialmente con fatti a carattere depressivo e che non è stata finora studiata da alcuno: l' altra che noi chiamiamo « varietà *B* », che produce invece fatti di esaltata attività neuro-muscolare e che probabilmente corrisponde a quella studiata dal Di Pietro.

Noi e dell' una e dell' altra varietà, che ci sembrano le più diffuse in natura, riferiremo in modo dettagliato i caratteri colturali e le esperienze sul potere patogeno. Quanto alle altre varietà di Penicillo che abbiamo isolato e che stiamo studiando, i risultati sono ancora troppo incompleti perchè possiamo ora pubblicarli. Di nessun' altra i caratteri differenziali si sono potuti stabilire in modo così netto come per le precedenti; tuttavia, quanto abbiamo ottenuto finora ci autorizza a ritenere che la massima parte delle varietà di Penicillo sono dotate di uno spiccato potere patogeno, il quale si manifesta secondo l' uno o l' altro tipo offerto dalle due varietà da noi studiate, non solo, ma che esse si comportano in modo analogo, tanto per i caratteri morfologici e colturali, quanto per il ciclo biologico.

Risulterebbe infatti dalle nostre ricerche che queste due varietà di Penicillo hanno uno sviluppo diverso secondo le stagioni: la varietà *A* prevale durante i mesi freddi (da Ottobre ad Aprile), la varietà *B* invece prevale nei mesi caldi (da Aprile ad Ottobre) e ciascuna presenta durante i periodi di massimo sviluppo più spiccati i caratteri del potere patogeno specifico.

Si ripeterebbe, cioè, qui quanto risulta per l' *Aspergillus fumigatus*, in cui il potere patogeno è maggiore nel tempo del massimo sviluppo, cioè in primavera ed in estate, a differenza del *flavescens* che ha il periodo di sviluppo nei mesi di autunno.

Anche rispetto alla diversa natura degli ambienti queste varietà di penicilli si sviluppano in modo diverso; ma i particolari che riguardano la diffusione e lo sviluppo di questi ifomiceti nei diversi ambienti e nelle diverse stagioni dell' anno, saranno pubblicati da uno di noi in un lavoro apposito, allo scopo sempre di far risaltare la loro importanza nella genesi e nella profilassi della pellagra.

I Penicilli, a quanto risulta finora, avrebbero rapporti di sviluppo analoghi a quelli delle due varietà da noi studiate, e si dividerebbero perciò in due grandi categorie, una, cioè, a caratteri patogenetici e biologici analoghi a quelli della varietà *A*, l' altra analoghi alla varietà *B*.

Insistiamo nel dire che si tratta qui di linee generali e non di fatti stabiliti in tutti i particolari: come abbiamo detto, le nostre ricerche sono finora incomplete, e solo un lungo e paziente lavoro potrà dare la sanzione definitiva a quanto abbiamo esposto e di cui ognuno può rilevare l' importanza per la genesi delle svariate forme con cui si presenta la pellagra.

Quanto alle due varietà studiate in modo completo, noi esporremo di ciascuna separatamente i caratteri morfologici e colturali, le ricerche sul loro potere patogeno, ed il meccanismo col quale questo si esplica. Ulteriormente in capitoli separati esamineremo l'importanza di ciascuna di esse nella genesi della pellagra, sia in rapporto alle forme della malattia, che in rapporto all' epoca in cui queste si presentano: in modo particolare sarà considerata l'importanza in confronto con quella degli Aspergilli, e specialmente del *fumigatus*.

### Varietà *A.* del Penicillo glauco

#### 1. — *Caratteri morfologici e colturali.*

Questa varietà di Penicillo glauco è stata isolata da tutte le varietà di mais avariato e da quasi tutti gli ambienti in cui è stata fatta la ricerca.

È una varietà a sviluppo piuttosto lento. Seminata in liquido di Raulin, solo dopo 24 ore si incominciano a vedere alla superficie dei piccolissimi punticini biancastri che vanno gradatamente ingrandendosi e che finiscono di solito, al termine della seconda giornata o al principio della terza, per formare uno strato completo, bianco, molto spesso, che copre tutta la superficie del liquido, risalendo anche leggermente sulle pareti del recipiente. Se lo sviluppo è molto rigoglioso, si formano qua e là delle grosse pieghe.

Solo dopo che la patina è completa, cioè verso la metà del terzo giorno, incomincia in modo visibile la formazione delle spore che si sviluppano in modo uniforme su tutta la superficie: questa diventa prima di un colore verdastro chiaro, che si fa sempre più intenso: al 5°-6° giorno essa è uniformemente di un colore verde scuro, che rimane così per 3 o 4 giorni, per poi gradatamente assumere una tinta brunastra. Verso il 12° giorno il colore è nettamente bruno ruggine e tale resta poi sempre,

diventando solo un poco più scuro. Anche nelle migliori condizioni di sviluppo però lo strato di spore che si forma non è mai così abbondante come per l' *Aspergillus fumigatus* ed anche per la varietà *B* di penicillo.

Parallelamente alla modificazione di colore della superficie sporificante, si ha pure un cambiamento alla superficie inferiore. Nei primi giorni essa è bianca, poi assume una tinta giallastra che si fa man mano più intensa: all' 8°-10° giorno è di colore giallo zafferano e tale rimane poi a lungo. Questa modificazione del colore è costante e si può considerare come caratteristica di questa varietà di Penicillo.

Il liquido di coltura diventa bruno rossiccio: la reazione sua, prima acida, diventa neutra e, talvolta, debolmente alcalina.

Il tempo dello sviluppo completo è di solito tra il 10° ed il 12° giorno: allora si ha una patina unita, a superficie uniforme od un po' ondulata, formata da un sottile strato di micelo pieghevole e resistente, con un velamento spesso di spore, che non si sollevano facilmente dalla superficie e che, anche meccanicamente, si possono asportare solo con qualche difficoltà. Successivamente il micelo si riduce gradatamente e lentamente di spessore e la patina diventa friabile. Questi caratteri si riferiscono alle patine ottenute nel periodo del massimo sviluppo. Nei mesi caldi i caratteri colturali si modificano alquanto. Mentre lo strato di micelo si forma abbastanza rapidamente ed è completo al terzo giorno, la sporificazione si fa invece in modo assai più lento ed è più scarsa: la patina non assume mai il colore verde intenso sopradescritto, ma è di un colore caffè grigiastro-chiaro, anche inferiormente il colore non è giallo mattone, ma di un grigio-giallastro sporco. Lo strato di spore è assai più scarso. Lo sviluppo completo delle patine è solo tra i 15-20 giorni.

Sul mais questa varietà di Penicillo si trova, come si è detto, sempre quando esso sia avariato o conservato in ambienti umidi. Si osserva però anche su altre sostanze vegetali, sui cereali, sui cibi di qualsiasi natura, ecc.

Coltivato artificialmente su mais sterilizzato, si ha un modo di sviluppo un po' diverso, a seconda del grado di umidità del mais stesso.

Se è molto asciutto, forma un velamento sottile di spore con degli addensamenti verso l'ilo, che danno alle cariossidi un aspetto simile a quelle avariate con *Aspergillus fumigatus*; il

colore però è più chiaro e le chiazze più sporgenti. Se l'umidità è maggiore, il germe ha uno sviluppo molto più rigoglioso e la cariosside resta ravvolta in modo uniforme da un grosso strato verde. Da questo, dopo un po' di tempo, escono dei ciuffi di micelo bianco che si incatenano e si aggrovigliano con quelli delle cariossidi vicine, in modo da trasformare il mais in una massa unica molto compatta, di colore biancastro con chiazze verdi. Le cariossidi subiscono pure una profonda trasformazione: prima la parte interna, più tardi anche l'esterna si rammolliscono, si spappolano e vengono a formare una densa poltiglia untuosa.

Questa varietà di Penicillo, sia in patina che sul mais, ha un odore caratteristico di muffa.

## II. — *Ricerche sul potere patogeno.*

Le proprietà patogene del germe furono studiate ad un dipresso coi criteri seguiti nelle ricerche sull' *Aspergillus fumigatus*. Per questo si eseguirono anche qui tre serie di ricerche:

1.° Introduzione diretta del germe nell' organismo.

2.° Nutrizione con materiale (mais o polenta) infetto di Penicillo.

3.° Estrazione dei tossici e iniezione agli animali.

In queste ricerche si è cercato sempre di tener calcolo speciale dell' epoca in cui erano eseguite, e ciò per i rapporti che, come abbiamo detto, paiono esistere tra il ciclo biologico ed il potere patogeno.

### 1.° Introduzione diretta del germe nell' organismo.

Si è praticata per la via endovenosa e per la via endoperitoneale.

*A.)* Via endovenosa.

Si è fatta solo un' esperienza.

Dalla superficie di una patina di 15 giorni (mese di Marzo) del diametro di cm. 30, bene sporificata, si asporta mediante spatola, la massima quantità possibile di spore, che si emulsionano in 30 cmc. di acqua distillata. Ne risulta un' emulsione bruna, omogenea, semitrasparente, affatto priva di frammenti grossi e di miceli.

Cane di Kg. 12 — Si mette allo scoperto la vena femorale di destra nella quale si iniettano lentamente (l' operazione è durata 5 minuti) 20 cm. dell' emulsione.

L' animale in principio nulla pare risentire dall' atto operatorio: dopo 20 minuti è un po' abbattuto e vomita abbondantemente: in seguito ha delle scariche diarroiche.

I fenomeni di abbattimento si fanno sempre più intensi: di tratto in tratto emette dei gemiti lamentevoli: dopo 2 ore torna a vomitare.

Dopo 5 ore è disteso al suolo oltremodo depresso: cammina solo se stimolato energicamente per accucciarsi dopo pochi passi. Tali fenomeni si fanno sempre più gravi e l' animale muore in capo a 12 ore.

Autopsia: Fegato, reni, milza e pia cerebrale congesti. Ai polmoni numerosi nodi congestizi tanto alla superficie quanto all'interno del tessuto.

Si è avuto qui nettissimo un quadro morboso caratterizzato da fenomeni intensi di depressione generale progressiva. Che la morte sia dovuta a un tossico specifico, risulta dalla concordanza coi sintomi delle esperienze successive.

*B)* Via endoperitoneale.

Le esperienze eseguite per questa via sono molto numerose e si distinguono in quattro gruppi: *a)* iniezione di emulsione ricavate da patine penicillari; *b)* di emulsioni ricavate da cariossidi maidiche infette; *c)* di frammenti grossi di patine; *d)* di cariossidi maidiche infette.

Si eseguirono queste serie di esperienze per stabilire le analogie e le diversità del meccanismo di azione in confronto coll' *Aspergillus fumigatus.* Noi sappiamo infatti che per questo germe i fenomeni sono bene diversi inoculando la spora isolata e la spora unita alla cariosside, avendosi in quest' ultimo caso specialmente acute le manifestazioni morbose: per i Penicilli invece le cose, come risulterà dalle singole esperienze, sono ben diverse.

Le iniezioni furono praticate a cavie, a conigli ed a cani.

*a)* Iniezione endoperitoneale di emulsioni ricavate da patine.

1.° (*Ottobre*). Coniglio di gr. 1830. — Si iniettano nel cavo peritoneale 10 cmc. di emulsione fatta togliendo il più possibile di spore da circa 20 cmq. di patina di 10 giorni bene sporificata.

L' animale non presenta fenomeni notevoli dopo l' iniezione: il peso, tranne qualche lieve oscillazione, è aumentato sempre. Viene ucciso dopo 20 giorni.

Autopsia: Organi perfettamente normali: nessuna traccia dell'emulsione.

2.° (*Novembre*). 20 cmq. di patina ricchissima di spore si emulsionano in 25 cmc. d' acqua distillata.

Cavia 1.ª — Iniezione di 12 cmc. Dopo due ore presenta segni di grave depressione, si muove mal volontieri, ha il pelo arruffato. I fenomeni di abbattimento si fanno progressivamente più intensi: dopo 18 ore l' animale muore.

Autopsia: Congestione intensa delle anse intestinali e del peritoneo: essudato siero-sanguinolento nel cavo peritoneale in cui si trova l' emulsione: organi interni iperemici.

Cavia 2.ª — Iniezione di 8 cmc. Fenomeni uguali alla precedente. Muore in 20 ore.

Autopsia: Reperto uguale al precedente.

3.° (*Novembre*). Una patina di 14 giorni, bene sporificata, del peso di gr. 25, viene privata del liquido di coltura ed emulsionata in 50 cmc. di acqua distillata. Il micelo viene allontanato filtrando attraverso a reticella metallica sterilizzata e a maglie assai ristrette.

Cane di Kg. 3,200. — Iniezione di 35 cmc.

L' animale presenta transitorî fenomeni di depressione. Viene ucciso dopo 10 giorni.

Autopsia: Organi interni normali, nessuna traccia dell' emulsione.

4.° (*Novembre*). Una patina di 20 giorni ricchissima di spore, del peso di gr. 30 circa, viene emulsionata finamente in 50 cmc. di acqua distillata.

Cane di Kg. 5. — Iniezione di 35 cmc.

Nessun fatto degno di nota, tranne una transitoria depressione generale. Viene ucciso dopo 10 giorni.

Autopsia: Organi interni normali: qua e là si osservano dei frammenti più grossi dell' emulsione, incapsulati da un sottilissimo strato connettivale, senza sostanza cremosa.

5.° (*Aprile*). Una patina di di 12 giorni, ricchissima di spore, di gr. 30, viene emulsionata in 50 cmc. di acqua distillata. Si filtra attraverso a rete metallica sterilizzata a maglie strettissime: il micelo viene così eliminato.

Coniglio di gr. 2070. — Si iniettano nel cavo peritoneale 20 cmc. di emulsione.

Diminuisce di peso per qualche giorno, poi si rimette. Viene ucciso dopo 15 giorni, mentre sta benissimo.

Autopsia: Organi interni di aspetto normale. Alla superficie del fegato, dei reni e della milza si osservano delle piccole porzioni di patina circondate da sottile tessuto connettivo.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. della stessa emulsione.

Muore in 50 ore con fenomeni di abbattimento progressivo: nessun fatto neuromuscolare.

Autopsia: Iperemia intensissima delle anse intestinali e del peritoneo con essudato siero-sanguinolento: pure congesti sono il fegato, i reni, la milza ed i polmoni.

Cavia 2.ª — Iniezione di 5 cmc. della stessa emulsione.

Muore in 36 ore con fenomeni uguali alla precedente.

Autopsia: Iperemia intensissima delle anse intestinali e del peritoneo con abbondante essudato siero-sanguinolento: pure congesti sono gli organi interni: nello spessore della parete addominale, in cui è penetrata una piccola parte di emulsione, si trova un largo essudato gelatinoso.

6.º (*Agosto*). 20 cmq. di patina di 12 giorni vengono emulsionati in 20 cmc. di acqua distillata.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. di emulsione. Presenta abbattimento notevole per alcune ore, deperisce per due giorni, ma sopravvive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. di emulsione. Presenta forte abbattimento per un giorno: deperisce notevolmente, ma sopravvive.

Risulta quindi che questa varietà di Penicillo, introdotta nell' organismo per la via peritoneale, produce fenomeni tossici caratteristici oltremodo gravi. Questi, nelle nostre esperienze, sono però riusciti evidenti solo nelle cavie, perchè a queste sole si è potuto introdurre nell' organismo una quantità sufficiente di materiale tossico: negli altri animali sarebbe stato necessario immetterne un volume enorme. È opportuno notare che i fenomeni di depressione negli animali sono oltremodo difficili ad apprezzarsi e che si può tener calcolo quasi solo dei risultati letali; il che per gli animali grossi rende le condizioni di esperienza molto più ardue a superarsi. Ad ogni modo la dimostrazione del potere patogeno del germe è evidente: il carattere specifico (depressione generale ed abbattimento) è risultato in modo netto.

*b)* Iniezione di emulsioni ricavate da cariossidi infette.

1.º (*Novembre 1902*). 25 cariossidi di mais, infette da 4 mesi e perciò quasi distrutte dal germe, vengono emulsionate in 20 cmc. di acqua distillata.

Cavia. — Iniezione endoperitoneale di 10 cmc.

L'animale non presenta fatti notevoli per l' iniezione: il peso sale continuamente: dopo 12 giorni è aumentata di 50 grammi e viene uccisa.

Autopsia: Il peritoneo non presenta traccia di reazione infiammatoria: gli organi hanno aspetto normale. Alla superficie del fegato si notano due chiazze di ispessimento connettivale attorno a frammenti dell' emulsione. Nessuna reazione leucocitaria.

2° (*Agosto 1902*). 15 cariossidi di mais avariato da 60 giorni, vengono emulsionate in 15 cmc. di acqua distillata. Le cariossidi maidiche sono ancora dure: lo strato di germe alla superficie non è molto abbondante: all' ilo si nota però che ha cominciato a penetrare all' interno.

Cavia di gr. 370. Iniezione di 5 cmc.

Il giorno dopo presenta 320 gr. ed è un po' abbattuta: poi il peso risale gradatamente. Nessun fatto neuromuscolare notevole. Viene uccisa dopo 34 giorni, pesando 475 grammi.

Autopsia: Organi perfettamente normali. Manca la benchè minima traccia di emulsione e di reazione infiammatoria nel cavo peritoneale.

Cavia di gr. 450. — Iniezione di 10 cmc. Dopo alcune ore è abbattuta: diminuisce di peso per due giorni, poi riaumenta. Nessun fatto neuromuscolare. Viene uccisa dopo 34 giorni, pesando 570 grammi.

Autopsia: Organi normali: nel cavo peritoneale manca ogni traccia di reazione infiammatoria e dell' emulsione.

3.° (*Gennaio 1903*). 50 cariossidi di mais infetto da 45 giorni, vengono emulsionate in 25 cmc. di acqua distillata. Le cariossidi sono coperte da un sottilissimo velo di spore con chiazze in vicinanza dell' ilo: internamente però hanno aspetto normale.

Cavia di gr. 340. — Iniezione di 10 cmc. Diminuisce in 2 giorni a 295 grammi, poi riaumenta. Non presenta fatti neuromuscolari, è però un po' abbattuta nella prima giornata. Viene uccisa dopo 28 giorni, pesando 460 gr.

Autopsia: Nessuna traccia dell' emulsione o di reazione nel cavo peritoneale: organi normali.

Cavia di gr. 350. — Iniezione di 15 cmc.

Il peso discende a 310 gr. in 4 giorni, poi risale. Abbattimento forte nelle prime 24 ore: nessun fatto di eccitamento neuromuscolare. Viene uccisa dopo 28 giorni, pesando 440 gr.

Autopsia: Nessuna traccia del germe o di reazione infiammatoria. Organi interni normali.

Le emulsioni anche molto dense di Penicillo coltivato sulle cariossidi maidiche non hanno manifestato un deciso potere tossico: la differenza colle emulsioni ricavate dalle patine è nettissima. Una ragione di questo fatto che, come vedremo, succede anche coll' inoculazione diretta delle cariossidi infette in confronto delle patine, non possiamo darcela, tanto più che la nutrizione con mais penicillare dà risultati ben differenti. Ci riserbiamo di chiarire questo punto con ulteriori ricerche.

*c)* Inoculazione intraperitoneale di patine penicillari.

Cavia 1.a di gr. 400. (*Agosto 1902*). — Si introducono nel cavo peritoneale 10 cmq. di patina di 10 giorni bene sporificata.

Fenomeni di abbattimento intenso e progressivo. Muore dopo 4 giorni pesando 300 gr.

Autopsia: Peritonite fibrinosa; anse intestinali ed organi interni fortemente congesti, la patina è ravvolta da un sottile velamento di fibrina. Manca ogni traccia di reazione leucocitaria.

Cavia 2.a (*Ottobre 1902*). — Si introducono nel peritoneo 5 cmq. di patina di 15 giorni ricchissima di spore.

Abbattimento intenso per 24 ore circa. Il peso discende a 490 gr. in due giorni, poi risale molto lentamente, ritornando come prima solo dopo 22 giorni. La cavia allora viene uccisa.

Autopsia: La patina è ravvolta da sottile tessuto connettivo con scarsissima sostanza cremosa. Manca ogni traccia di reazione infiammatoria nel resto del peritoneo; gli organi hanno aspetto normale.

Cavia 3.a (*Ottobre 1902*) — di gr. 470. Inoculazione di 10 cmq. di patina di 15 giorni.

Abbattimento progressivo e diminuzione continua di peso. Al terzo giorno l'animale ha il pelo arruffato. Nessun fatto di esaltamento neuro muscolare. Muore dopo 6 giorni pesando 310 gr.

Autopsia: Peritonite siero-fibrinosa: aderenze tra le anse intestinali e la parete addominale: la patina è circondata da tessuto connettivo di neoformazione: senza sostanza caseosa. Organi interni congesti.

Cavia 4.a di gr. 560 (*Novembre 1902*). — Inoculazione di 10 cmq. di patina di 6 giorni bene sporificata.

Presenta fatti di abbattimento intenso: dopo alcune ore è incapace di camminare anche se stimolata energicamente. Muore dopo 24 ore.

Autopsia: Essudato siero sanguinolento nel cavo peritoneale con velamenti fibrinosi sulle anse intestinali ed alla superficie degli organi interni che sono congesti. L' emulsione è libera nel cavo.

Cavia 5.a di gr. 570. (*Dicembre 1902*). — Inoculazione di 10 cmq. di patina di oltre due mesi assai ricca di spore.

Muore dopo 24 ore con fatti di abbattimento progressivo.

Autopsia: Essudato peritoneale siero-sanguinolento: congestione generale degli organi interni, specialmente dell' intestino. L' essudato peritoneale seminato in brodo dimostra l'esistenza dei germi comuni: il sangue del cuore è invece negativo,

Cavia 6.ª di gr. 680. (*Dicembre 1902*). — Inoculazione di 5 cmq. di patina di oltre due mesi.

È un po' depressa per due giorni: il peso diminuisce per 2 giorni discendendo a 480 gr., poi si rimette lentamente. Viene uccisa dopo 30 giorni.

Autopsia: La patina è ravvolta da sottile tessuto connettivo: gli organi interni sono normali.

Coniglio 1.° di gr. 1800. (*Novembre 1902*). — Inoculazione di 10 cmq. di patina di 6 giorni.

L' animale presenta depressione per alcune ore: diminuisce di peso per due giorni fino a 1550 gr.: poi si rimette lentamente. Viene ucciso dopo 21 giorni.

Autopsia: La patina è incapsulata da tessuto connettivo sottile con scarsissima reazione leucocitaria. Gli organi interni sono normali.

Coniglio 2.° di gr. 2090 (*Dicembre 1902*). — Inoculazione di 12 cmq. di patina di 9 giorni.

Presenta fatti di abbattimento non molto forte: muore dopo 70 ore.

Autopsia: Lieve reazione con sottile strato fibrinoso attorno alla patina. La morte è dovuta ad un processo di pleuro-polmonite bilaterale di vecchia data. Il polmone destro presenta completa epatizzazione grigia.

L' inoculazione di patine penicillari ha dunque dato risultati analoghi a quelli ottenuti con emulsioni ricavate dalle patine stesse, essendo nell' un caso e nell' altro necessaria una quantità presso a poco uguale di germe per produrre la morte. I fenomeni morbosi sono stati identici: la reazione locale data da fenomeni congestivi con scarsissima o mancante reazione leucocitaria. Notiamo qui che l' età della patina non pare abbia una grande importanza nel produrre i fenomeni: questo fatto risulterà con maggiore evidenza quando esporremo i risultati ottenuti cogli estratti.

*d*). Inoculazioni di cariossidi infette.

Cavia 1.ª di gr. 480. (*Agosto 1902*). — S' inoculano 3 cariossidi di mais infetto da 60 giorni (strato uniforme di spore penetranti parzialmente all' interno).

Diminuisce in 2 giorni fino a 315 gr., poi si rimette. Non presenta fatti neuro-muscolari nè dà segni di abbattimento. Viene uccisa dopo 30 giorni.

Autopsia: Cariossidi ravvolte con sottile tessuto connettivo senza reazione leucocitaria: organi interni normali.

Cavia 2.ª di gr. 480. (*Agosto 1902*). — Inoculazione di 6 cariossidi infette da 60 giorni.

Il peso discende a 305 gr. dopo 2 giorni, poi risale: l' animale è abbattuto nelle prime 24 ore. Viene ucciso dopo 34 giorni, pesando 590 gr.

Autopsia: Cariossidi incapsulate da tessuto connettivo sottile: manca ogni traccia di reazione leucocitaria. Organi normali.

Cavia 3.ª di gr. 380 — (*Settembre 1902*). Inoculazione di 6 cariossidi infette da 45 giorni. Le cariossidi sono coperte da un sottile velo di spore addensate qua e là in chiazze: internamente appaiono ancora normali.

È depressa nelle prime 24 ore: il peso discende in 2 giorni a 330 gr. poi l' animale si rimette. È ucciso dopo 28 giorni, pesando 530 gr.

Autopsia: Cariossidi ravvolte da sottile tessuto connettivo senza reazione leucocitaria: organi normali.

Cavia 4.ª di gr. 390. — Inoculazione di 6 cariossidi come le precedenti.

È depressa nelle prime 24 ore: il peso diminuisce nei primi due giorni, poi risale. È uccisa dopo 28 giorni, pesando gr. 540.

Autopsia: Organi interni normali: cariossidi ravvolte da sottile tessuto connettivo senza reazione leucocitaria.

Cavia 5.ª di gr. 400. (*Ottobre*, il mais era di *Agosto*). — Inoculazione di 4 cariossidi colla parte interna pressochè distrutta dal germe.

Il peso discende in 5 giorni a 320 gr. poi risale. La cavia è un po' depressa nelle prime 30 ore. Nessun fatto neuro-muscolare. Viene uccisa dopo 19 giorni.

Autopsia: Cariossidi ravvolte da tessuto connettivo neoformato senza sostanza caseosa. Organi interni normali.

Cavia 6ª di gr. 430. — Inoculazione di 7 cariossidi come le precedenti.

Depressione forte nei primi 2 giorni: il peso discende a 350 gr. in 4 giorni. L' animale è ucciso dopo 19 giorni mentre sta bene.

Autopsia: Cariossidi incapsulate da tessuto di neoformazione senza sostanza caseosa. Le anse intestinali sono parzialmente adese alla parete addominale. Gli organi interni hanno aspetto normale.

Cavia 7.ª di gr 600. (*Novembre 1902*). — Inoculazione di 10 cariossidi infette da 25 giorni. Germe rigogliosamente sviluppato alla superficie.

Muore con fatti di abbattimento forte e progressivo dopo 70 ore.

Autopsia: Essudato sieroso del cavo peritoneale: cariossidi coperte da sostanza fibrinosa con scarsissima reazione leucocitaria. Anse intestinali ed organi congesti.

Le cariossidi infette con questa varietà di *Penicillum glaucum* introdotte direttamente nell' organismo animale esercitano quindi un potere patogeno molto lieve, poichè solo con 10 si è potuto avere la morte di una cavia. La differenza con quanto si osserva per l'*Aspergillus fumigatus* è grandissima e corrisponde a quanto si ha introducendo le emulsioni penicillari ricavate da cariossidi infette, le quali hanno spiegato un potere patogeno molto scarso di fronte alle emulsioni ricavate dalle patine. Come abbiam già detto, solo uno studio prolungato e minuto ci darà la spiegazione del modo differente di comportarsi del Penicillo glauco sviluppatosi sul mais o coltivato su liquido di Raulin.

Da questa serie di esperienze risulta adunque che questa varietà di Penicillo introdotta direttamente nell'.organismo, sia in emulsione di spore che completa come è nella patina, determina fenomeni caratteristici molto gravi e la morte dell' animale solo quando è introdotta in quantità piuttosto rilevanti. I fenomeni sono inoltre assai più intensi se il germe è stato coltivato su liquido di Raulin che se è cresciuto sul mais: fatto questo che spiega i risultati negativi avuti da uno di noi nelle esperienze praticate in confronto coll' *Aspergillus*.

I caratteri di tossicità consistono in depressione generale, abbattimento forte e progressivo, rilasciamento muscolare. Mancano totalmente fatti neuromuscolari analoghi a quelli prodotti dall' *Aspergillus fumigatus*.

La reazione locale prodotta dall' introduzione del germe è quasi sempre molto lieve, consistendo di solito, (quando si è introdotta la cariosside o la patina) in incapsulamento fatto da tessuto connettivo sottile poco maggiore di quello che si ha attorno alle cariossidi maidiche perfettamente asettiche. Solo quando la morte, per introduzione di patine si ebbe acutissimamente, si poterono notare dei fatti congestivi intensi, e ciò si comprende bene; ad ogni modo notiamo che attorno alle patine introdotte in quantità non mortale si trovò all'autopsia solo una mediocre neoformazione connettivale.

Questo è dovuto alla rapida ed intensa fagocitosi sia delle spore che del micelo ed alla conseguente distruzione ed eliminazione dall' organismo animale. Noi l' abbiamo potuta osservare parecchie volte, e sopra questo richiamiamo l' attenzione pel contrasto con quanto si ha coll' *Aspergillus fumigatus* iniettato

sia in emulsione, che unito alla cariosside, quantità assai minori del quale producono delle lesioni locali molto forti con intensa reazione leucocitaria e senza che si possano dimostrare fatti di fagocitosi.

Si ha cioè un meccanismo d'azione molto diverso per l'una e per l'altra specie di germe: il Penicillo agisce per la quantità di tossico che contiene al momento dell' introduzione nell' organismo e si comporta di poi solo come corpo straniero: l'*Aspergillus fumigatus* ha un' azione patogena assai più intensa e più continua. Su questo ritorneremo in seguito.

Quanto allo stabilire a quale parte del germe spetti in modo preponderante il potere tossico, se alla spora od al micelo, le esperienze descritte non danno una risposta precisa, essendosi avuti fenomeni pressochè uguali coll' iniezione di spore sole e di patine.

2. — Effetti della nutrizione con materiale infetto da Penicillo.

Dopo i risultati delle esperienze suesposte ottenuti coll' introduzione diretta delle spore penicillari nell'organismo, abbiamo intrapreso una nuova serie di ricerche, introducendole invece per le vie digerenti.

È inutile richiamare l' attenzione sopra l' importanza di queste ricerche che si sono praticate in condizioni più prossime a quanto succede in natura. È noto infatti che il Penicillo entra di solito nell' organismo cogli alimenti inquinati.

Anche qui si sono alimentati degli animali o con mais infetto (che era preparato in modo da rendere scarso lo sviluppo del micelo, cioè pochissimo umido), o con polenta mista a patine penicillari.

Le esperienze col mais infetto si poterono praticare solo con cavie, perchè i conigli ed i cani lo rifiutavano ostinatamente: quelle colla polenta furono fatte con cavie, conigli e cani.

*A*. Effetti della nutrizione con mais penicillare.

Esperienza I.ª — *Novembre 1902* - 5 cavie adulte sono sottoposte ad alimentazione con mais infetto da un mese circa. Le cariossidi sono coperte da un velo di spore, che qua e là, specialmente presso l' ilo, formano delle chiazze evidenti. Internamente esse sono pressochè intatte.

Cavia 1.ª — Diminuisce di peso: dopo 3 giorni ha il pelo arruffato ed è abbattuta: non ha diarrea: non presenta fatti neuromuscolari. Muore dopo 6 giorni essendo il suo peso di 500 disceso a 435 grammi.

Autopsia: Non c' è essudato pleurale o peritoneale: i polmoni sono lievemente iperemici. Congestione discreta dello stomaco, lieve dell'intestino.

Esame colturale: Fegato, milza, sangue del cuore: negativo.

Cavia 2.ª — Dopo 4 giorni ha il pelo arruffato ed è depressa: non ha diarrea nè presenta fatti neuromuscolari: deperisce fortemente. Muore dopo 8 giorni essendo discesa da 490 a 280 grammi.

Autopsia: Iperemia allo stomaco e delle prime porzioni del tenue che contengono del muco. Nulla agli altri organi.

Esame colturale: Fegato, rene, milza, peritoneo, sangue del cuore: negativo.

Contenuto intestinale: Positivo.

Cavia 3.ª — Muore dopo 13 giorni essendo discesa da 510 a 400 gr. Non ha avuto diarrea nè fatti neuro-muscolari: Dal quinto giorno in poi ha presentato segni di abbattimento progressivo.

Autopsia: Lieve iperemia intestinale e gastrica: nulla agli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 4.ª — Muore dopo 15 giorni essendo discesa da 720 a 620 gr. Non ha presentato fatti neuro-muscolari, nè ha avuto diarrea. Al quinto giorno ha cominciato ad essere abbattuta, depressa, col pelo arruffato.

Autopsia: Lieve iperemia del tenue: stomaco contenente liquido mucoso. Nulla agli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 5.ª — È uccisa dopo 10 giorni essendo discesa da 560 a 320 gr.: era molto depressa, col pelo arruffato.

Autopsia: Lo stomaco è lievemente congesto e contiene del liquido mucoso: gli altri organi sono normali.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Esper. II.ª — *Dicembre 1902.* - Tre cavie vengono sottoposte a nutrizione con mais penicillare infetto da un mese e mezzo. Il mais è coperto da un velo di spore con scarso micelo: l' interno delle cariossidi è alterato in vicinanza dell' ilo.

Cavia 1.ª — Dopo 4 giorni è abbattuta ed ha il pelo arruffato: deperisce continuamente e muore al settimo giorno.

Autopsia: Organi di aspetto normale. La prima porzione del duodeno è iperemica e contiene del catarro.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 2.ª — Muore dopo 4 giorni fortemente abbattuta e depressa. Autopsia: Organi lievemente congesti: il tenue contiene del catarro: non vi è essudato peritoneale.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 3.ª — Muore fortemente abbattuta e depressa dopo 3 giorni. Autopsia: Lieve congestione degli organi interni: catarro lieve del tenue. Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Esper. III.ª — *Gennaio 1903.* - Quattro cavie vengono sottoposte alla alimentazione con mais penicillare infetto da 2 mesi circa. Il mais è coperto da uno scarso strato di micelo: l'interno delle cariossidi è alterato solo in vicinanza dell' ilo.

Cavia 1.ª — Muore con segni di depressione generale forte e progressiva dopo 4 giorni. Nessun fatto neuro-muscolare: non diarrea.

Autopsia: Lieve iperemia del tenue: nulla di notevole negli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 2.ª — Già al terzo giorno è fortemente abbattuta: viene uccisa al quinto giorno in cattive condizioni. Nessun fatto neuro-muscolare.

Autopsia: Iperemia delle prime porzioni del tenue, negli altri organi nulla di notevole.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 3.ª — Muore con forte depressione generale e con rapido deperimento dopo 6 giorni. Non ha avuto diarrea: non ha presentato fatti neuro-muscolari.

Autopsia: Iperemia delle anse intestinali e dello stomaco, lieve congestione polmonare.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cavia 4.ª — Muore dopo 6 giorni con forte deperimento e con fatti di depressione generale. Non ha avuto diarrea.

Autopsia: Reperto identico al precedente.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

*B.* Effetti della nutrizione con polenta mescolata a patine penicillari.

Si mescolano delle patine penicillari bene sporificate. private il più possibile del liquido di coltura, a della polenta fatta con farina di mais sano. La mescolanza era sempre fatta con due patine dell' età di 12-15 giorni ed 1 Kg. di polenta: con impastamento prolungato si rendeva uniforme la distribuzione del

germe nel cibo. La polenta veniva rinnovata ogni due o tre giorni. Si esperimentò sopra cavie, conigli e cani, che si adattarono bene a tale nutrizione.

Esperienza I.ª — Due cavie si nutrono con polenta mista a patine penicillari

Cavia 1.ª — Dopo alcuni giorni comincia a deperire, muore assai dimagrata dopo 31 giorni. Ha presentato fenomeni di abbattimento notevole negli ultimi giorni; non ha avuto diarrea

Autopsia: Lieve essudato nel cavo peritoneale; il tenue è un poco congesto.

Esame colturale: Fegato, milza, reni: negativo.

Essudato peritoneale: Positivo in una provetta, negativo nell' altra.

Cavia 2.ª — Deperimento forte e progressivo dopo alcuni giorni. Abbattimento forte. Muore dopo 23 giorni.

Autopsia: Lieve congestione del tenue e dei polmoni; nulla di notevole agli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Esper. II.ª — Quattro conigli vengono sottoposti a nutrizione di polenta mista a patine penicillari.

Coniglio 1.º peso gr. 2150. — Dopo 10 giorni si manifesta lieve diarrea che dura 8 giorni e poi cessa. Il peso che è cominciato a diminuire al secondo giorno, continua sempre a discendere. Nessun fatto neuro-muscolare, depressione generale. L' animale muore dopo 37 giorni essendo disceso a 1600 gr.

Autopsia: Lievissima congestione del tenue e dei polmoni. Nulla agli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Coniglio 2.º peso gr. 2200. — Dopo 2 giorni si manifesta diarrea non molto forte, il peso diminuisce rapidamente: si ha la morte dopo 8 giorni, pesando l'animale 1335 grammi. Depressione forte dopo 4 giorni.

Autopsia: Iperemia dello stomaco e del tenue con lieve catarro, congestione epatica.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi,

Coniglio 3.º peso gr. 1900. — Presenta delle notevoli oscillazioni nel peso, non ha diarrea, non presenta fatti a carico del sistema neuromuscolare. Muore dopo 45 giorni, pesando gr. 1450.

Autopsia: Lieve iperemia del tenue, degenerazione grassa iniziale del fegato, nulla agli altri organi. Nel peritoneo scarso essudato.

Esame colturale: Fegato, reni, milza: negativo.

Essudato peritoneale: Negativo in due provette, positivo in due altre.

Coniglio 4.° peso gr. 2150. — Non ha diarrea. In principio presenta forti oscillazioni nel peso, che una volta è anche superiore al peso primitivo. Dopo un mese però deperisce in modo progressivo ed è molto abbattuto. Muore dopo 67 giorni, pesando 1450 gr.

Autopsia: Nulla di notevole nè all' intestino nè agli altri organi.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Esper. III.ª — Due cani vengono sottoposti a nutrizione con polenta mista a patine.

Cane 1.° peso gr. 3850. — Non presenta fatti neuromuscolari, non ha diarrea. Mangia sempre con appetito la polenta somministratagli. Negli ultimi giorni è abbattuto assai. Muore dopo 2 mesi pesando 2300 gr.

Autopsia: I reni e le anse intestinali sono molto pallidi, gli altri organi non presentano fatti degni di nota.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Cane 2.° peso gr. 3490. — Non ha diarrea. Mangia sempre avidamente la polenta. Per un mese è vivace, il peso non diminuisce, anzi è talvolta superiore, poi si manifesta un'emaciazione progressiva, ed il cane muore dopo 101 giorni pesando 2050 gr.

Autopsia: L' adipe mesenterico è completamente scomparso, le anse intestinali ed i reni sono pallidi, il fegato ha un' aderenza di vecchia data col diaframma. Polmoni e pleure normali.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi.

Da tutte queste esperienze risulta dunque che sia le cavie che i conigli ed i cani, alimentati con cibi infetti con questa varietà di Penicillo, ne risentono un effetto tossico, che determina un deperimento progressivo e la morte, senza fatti di eccitamento neuromuscolare evidente. Costanti invece sono i fatti di depressione generale e di abbattimento, affatto simili a quelli che si hanno introducendo direttamente nell' organismo le spore o le patine penicillari.

È mancata quasi sempre la diarrea (vi fu infatti solo in due conigli ed affatto transitoria), a differenza di quanto si osserva cogli Aspergilli *fumigatus e flavescens*, che, introdotti nel tubo gastro-enterico colle sostanze nutritive, determinano, specialmente nelle cavie, una forte diarrea. Corrispondentemente, mentre in questi casi il reperto anatomo-patologico dimostrò sempre intense e gravi lesioni locali, con congestione delle pareti intestinali, erosioni della mucosa, catarro muco-sanguinolento, essudato

peritoneale, ecc., tali fatti furono invece o scarsi, o, talvolta, mancanti del tutto negli animali sottoposti a nutrizione penicillare. In questi del resto si ha in generale una tendenza a fatti cronici: mentre pel *fumigatus* si tratta sempre di fenomeni acutissimi.

Un' altra cosa su cui richiamiamo in modo speciale l'attenzione è il mancato passaggio delle spore penicillari in circolo (perchè non è possibile dare importanza ai due reperti positivi, anche questi osservati solo per lo scarso essudato peritoneale) ed alla corrispondente mancanza di lesioni anatomo-patologiche gravi negli organi interni, mentre è noto che le spore aspergillari entrano quasi costantemente in circolo determinando dei gravi fatti flogistici negli organi in cui si localizzano, e ci basti qui ricordare le frequenti pleuriti e pericarditi, i focolai congestizî ed emorragici dei polmoni, dai quali appunto si coltiva costantemente l' aspergillo.

Per il penicillo adunque la morte è esclusivamente determinata dal tossico liberatosi nel tubo gastro-enterico ed entrato in seguito in circolo.

È notevole la rapidità della morte delle cavie nutrite con mais penicillare, in confronto di quelle nutrite con polenta a cui si erano mescolate delle patine; la ragione di questo fatto, che è in contraddizione con quanto si osserva invece coll'introduzione diretta del germe nell' organismo, e che perciò non può esser messo in rapporto con un aumento del potere tossico del germe cresciuto sul mais, per ora ci sfugge. Notiamo solo che un fatto simile si osserva per l' *Aspergillus fumigatus;* l' altra varietà di Penicillo si comporta invece come vedremo, in modo molto diverso. I nostri risultati differiscono notevolmente da quelli osservati dal Ferrati per la mancanza assoluta di fenomeni neuro-muscolari, il che probabilmente dipende dall' aver adoperato varietà differenti di germi.

### 3. — Estratti tossici.

Possiamo distinguere per comodità di esposizione, in due serie le ricerche da noi fatte attorno alle sostanze tossiche di questa varietà di Penicillo glauco: l' una, che esporremo per prima, riguardante il potere patogeno in genere ed il suo modo di comportarsi nelle diverse epoche dell'anno, l'altra riguardante i caratteri generali e la natura del tossico stesso.

Non tutte le questioni sono state risolte: ma sopra di ciò ritorneremo in ulteriori pubblicazioni.

Parte I.ª — Diciamo subito che tutti i risultati descritti in questa serie di esperienze sono stati ottenuti bollendo in alcool le patine penicillari bene sporificate.

Col mais infetto abbiamo fatto solo poche esperienze, per vedere se esistesse una diversità nelle manifestazioni tossiche: constatato che gli effetti sono identici, abbiamo abbandonata l' estrazione da questo materiale, che esige un consumo enorme di alcool. Piccole quantità di mais penicillare (150-200 gr.) ci diedero sempre risultati negativi: bisognò salire a 400-500 gr. per avere risultati sicuri.

Descriviamo per brevità una sola delle esperienze praticate.

800 gr. di mais penicillare di due mesi, col germe sviluppato in chiazze sottili alla superficie delle cariossidi, specialmente in vicinanza dell' ilo (l' interno è pochissimo alterato), vengono bolliti in alcool che si filtra e si evapora. Il residuo (che non dà reazione al percloruro di ferro) viene ripreso con 80 cmc. di acqua distillata.

Cane di Kg. 8. — Si iniettano nel cavo peritoneale 40 cmc. di estratto. Dopo un quarto d' ora ha vomito che si ripete altre quattro volte. Dopo 30 minuti circa cominciano i segni di depressione generale: il cane cammina molto malvolontieri, dopo alcuni passi si adagia sul treno posteriore: ha la testa ciondoloni e, chiamato, la solleva a fatica. Questi fatti si aggravano sempre più, dopo un' ora rifiuta di camminare ed ha il contegno di un individuo che caschi dal sonno. Sta cioè seduto sul treno posteriore lasciando ciondolare il capo che lentamente va fin quasi a toccare il suolo, e rialzandolo poi bruscamente come di soprassalto. Le palpebre e le labbra afflosciate, cascanti gli danno un aspetto caratteristico. Dopo un' ora e mezza circa si sdraia sul suolo contro il quale tiene fortemente compresso l' addome, che è oltremodo dolente: il cane infatti emette frequentemente dei guaiti lunghi e lamentevoli, che diventano molto più intensi se gli si palpa il ventre. L' abbattimento si fa sempre più grave: il cane muore dopo 6 ore.

Autopsia: Congestione oltremodo intensa del cavo peritoneale e delle anse intestinali con essudato siero-sanguinolento abbondante (oltre 100 cmc.); il grande omento ed il mesentere sono disseminati di emorragie: il fegato ed i polmoni sono congesti; i reni duri al taglio. La pia madre cerebrale è iperemica: il midollo spinale non presenta fatti notevoli.

Cavia 1.ª Iniezione di 5 cmc. — Presenta fenomeni di depressione per alcune ore: poi lentamente si rimette.

Cavia 2.ª Iniez. di 10 cmc. — Fatti di depressione intensa dopo mezz' ora: il quadro aumenta continuamente di intensità: muore dopo 10 ore.

Autopsia: Congestione del cavo peritoneale e delle anse con essudato siero-sanguinolento. Gli altri organi sono congesti.

Il risultato di questa e di altre esperienze ha dimostrato l'identità assoluta degli effetti del mais e delle patine penicillari: al germe adunque è necessariamente dovuto il quadro sintomatologico descritto. Per questo noi nelle nostre ricerche ci siamo serviti solo delle patine penicillari, di molto più facile e comoda preparazione e molto più economiche.

Si usarono sempre delle patine bene sporificate, di età varia tra i 6 ed i 15 giorni (in questi limiti di tempo il potere tossico non varia), che venivano bollite per 30-40 minuti in una quantità di alcool quintupla in peso: l'alcool dopo veniva filtrato ed evaporato, il residuo ripreso con acqua distillata (la metà in cmc. del peso in grammi delle patine). Notiamo che volta per volta il germe veniva isolato dall'ambiente.

Ecco ora i risultati delle esperienze praticate, come si è detto, in vari periodi dell'anno, sperimentando sopra topi, cavie conigli e cani.

Esperienza I.ª — *Dicembre*. - Due patine di Penicillo di 7 giorni, bene sporificate, vengono bollite in alcool. Il residuo dell'evaporazione è ripreso con 50 cmc. di acqua.

Cane — Iniezione di 25 cmc. - Vomito intenso dopo alcuni minuti. Poi ha fenomeni di abbattimento forte per oltre 6 ore (testa ciondolante, cammino stentato e lento, ecc.), ma si rimette. Notevole l'intensa poliuria. Il giorno dopo sta bene.

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Topo | 1.° | Iniez. | di | $^1/_2$ cmc. | — Non presenta fatti notevoli. |
| id. | 2.° | id | id. | $^3/_4$ id. | id. id. id. id. |
| id. | 3.° | id. | id. | 1 id. | id. id. id. id. |
| id. | 4.° | id. | id. | 1,5 id. | id. id. id. id. |
| id. | 5.° | id. | id. | 2 id. | Se ne sta accasciato ed abbattuto per due ore: poi si rimette. Dopo 5 ore sta benissimo. |
| id. | 6.° | id. | id. | 3 id. | Dopo alcuni minuti abbattimento forte: muore dopo due ore. Autopsia: Iperemia intensa del peritoneo e delle anse intestinali. |

Topo 7.° Iniez. di 4 cmc. Muore in due ore con fatti di abbattimento progressivo.

Autopsia: Iperemia intensa del peritoneo e delle anse intestinali.

È notevole in questi casi la rapidità dell'insorgere dei fenomeni: già dopo pochi minuti i topolini erano accasciati in istato di torpore: dopo mezz'ora non reagivano nemmeno schiacciando loro la coda o le zampe.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc.

Dopo alcuni minuti si muove molto pigramente e malvolontieri: dopo un'ora è distesa sul suolo incapace di muoversi: ritira gli arti solo se si comprimono molto energicamente o si pungono; i riflessi sono pressochè spenti. Tali fatti si accentuano sempre più; dopo 3 ore resta immobile in qualunque posizione sia posta. Muore dopo 6 ore.

Autopsia: Iperemia del peritoneo e delle anse intestinali; congestione del fegato e dei reni.

Cavia 2.ª — Iniezione di 5 cmc.

Fenomeni uguali ai precedenti: morte in 7 ore.

Autopsia: Reperto identico.

Esper. II.ª (*Gennaio*) — Tre patine di 10 giorni, di colore verde piuttosto scuro, molto ricche di spore vengono bollite in alcool. Il residuo è ripreso con 50 cmc. di acqua

Cavia 1.ª — Iniezione di 10 cmc. Già dopo alcuni minuti presenta fenomeni di abbattimento assai forte: si muove solo dietro stimoli energici. Dopo mezz'ora è incapace di muoversi, è distesa sul pavimento completamente inerte, ritira le zampe solo se le vengono schiacciate fortemente. Muore dopo 3 ore.

Autopsia: Iperemia fortissima del peritoneo, delle anse intestinali e del mesentere.

Cavia 2.ª — Iniezione di 5 cmc.

Dopo mezz'ora è abbattuta; dopo un'ora è distesa sul suolo incapace di camminare; reagisce molto pigramente agli stimoli. Tali fatti dopo un paio d'ore vanno gradatamente diminuendo; l'animale è completamente rimesso in capo a sei ore.

Cane di Kg. 6. — Iniezione di 20 cmc.

Dopo 10 minuti l'animale si accuccia. Facendolo camminare è evidente una grande debolezza generale, infatti ad ogni momento si ferma. Dopo mezz'ora rifiuta ostinatamente di camminare e se ne sta in un canto appoggiato sul treno posteriore in istato di sonnolenza. Il tono

muscolare è depresso, i muscoli sono rilasciati ovunque, e ciò è specialmente rilevabile al muso che presenta le palpebre abbassate e le labbra cascanti. L' animale si contiene come uno che caschi dal sonno: lascia discendere gradatamente il capo fin quasi a toccare il terreno per poi risollevarlo bruscamente.

Poi si distende sul suolo coll' addome a terra e gli arti distesi. Talvolta emette dei gemiti. In tale stato dura per 3 ore circa, poi gradatamente si rimette. Non ha vomitato. Il giorno dopo sta bene.

Esper. III.ª (*Febbraio*). — Due patine di 10 giorni vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 45 cmc. d' acqua.

Cane di Kg. 7,500. — Iniezione endoperitoneale di 30 cmc. - Dopo 10 minuti cominciano i fenomeni di depressione generale come nel caso precedente: si ha cioè anche qui debolezza, rilasciamento della muscolatura diminuzione del tono muscolare e dei riflessi. L' animale dopo due ore circa è disteso sul suolo incapace di muoversi e coll' addome compresso contro il terreno. Ha vomito e numerose scariche prima poltacee, poi liquide. Emette spesso gemiti lamentevoli: toccato nell' addome urla dal dolore. Muore dopo 15 ore con fenomeni di abbattimento progressivo.

Autopsia: Congestione intensissima del peritoneo e delle anse intestinali con abbondante essudato siero-sanguinolento. Iperemia della pia cerebrale.

Coniglio di gr. 2000. — Iniezione dei 15 cmc. residui. Presenta fenomeni di forte abbattimento per oltre due ore, dopo le quali gradatamente si rimette.

Esper. IV.ª (*Marzo*). — Due patine di 12 giorni vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 5 circa. — Iniezione di 40 cmc. Dopo alcuni minuti comincia l' abbattimento forte ed insorge gradatamente un quadro identico ai precedenti. Notevole il completo rilasciamento muscolare che dà al cane un aspetto caratteristico. Pure forti sono la diarrea e la poliuria. Morte dopo 15 ore.

Autopsia: Congestione intensa del peritoneo e delle anse intestinali con essudato sanguinolento. Pia cerebrale iperemica, organi interni pure.

Esper. V.ª (*Giugno*). — Due patine di 12 giorni vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. Iniezione di 40 cmc.

Vomito dopo 20 minuti, che si ripete parecchie volte. Dopo mezz' ora incomincia il solito quadro: l' animale muore in 12 ore. Oltremodo forti la diarrea e la poliuria.

Autopsia: Intensa congestione delle anse intestinali e del peritoneo che contiene essudato siero-sanguinolento. Il grande omento è disseminato di emorragie puntiformi. Il fegato, i polmoni e la pia cerebrale sono congesti. I reni sono duri al taglio; il midollo spinale non presenta fatti notevoli.

Esper. VI.ª (*Agosto*). — Tre patine di 20 giorni, molto sottili, cresciute molto lentamente, con strato di spore piuttosto scarso, di colore rugginoso chiaro, vengono bollite in alcool. Il residuo è ripreso con 50 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 10. — Iniezione di 40 cmc.

Vomito dopo mezz'ora: il quadro solito insorge piuttosto lentamente, l' abbattimento generale e la depressione sono spiccate solo dopo 3 ore: invece è oltremodo intenso il dolore addominale. Gemiti molto frequenti: parecchie scariche prima poltacee, poi liquide: poliuria intensa. Muore dopo 14 ore.

Autopsia: Congestione intensa del cavo peritoneale e delle anse intestinali con abbondantissimo essudato siero-sanguinolento (150 cmc.): mesentere e grande omento disseminati di emorragie: fegato, polmoni, pia cerebrale molto congesti; nulla di notevole al midollo spinale; reni duri al taglio e piuttosto pallidi.

Da tutte queste esperienze risulta che da questa varietà di penicillo si può, mediante la bollitura con alcool a 90°, estrarre una sostanza tossica oltremodo attiva, che, inoculata negli animali, determina un quadro sintomatologico caratteristico, nel quale dominano i fenomeni di depressione generale e di rilasciamento. I fenomeni sono identici colle patine pure e col mais penicillare e si devono perciò ritenere indipendenti dal *substratum* su cui il germe ha vegetato.

Questi tossici producono delle lesioni anatomo-patologiche costanti e molto gravi: specialmente notevoli sono i fatti locali, cioè la congestione intensa del peritoneo, delle anse intestinali, del grande omento (che presenta sempre dagli stravasi sanguigni) e del fegato, e l' essudato siero-sanguinolento abbondantissimo. Nessun altro tossico, per quanto a noi risulta, produce fatti locali così gravi.

Tutti gli animali presentano un ugual modo di reazione: il coniglio pare sempre, come per l' altro penicillo e per i tossici aspergillari, il più resistente.

È interessante il fatto che qualunque siano le condizioni biologiche di sviluppo, il potere tossico pare cangiare ben poco: in ispecial modo sorprendono i risultati ottenuti colle patine di Agosto, che, come è detto nella descrizione dell' esperienza, si erano sviluppate assai lentamente e si presentavano molto sottili e scarse di spore. Ciò naturalmente ha valore solo dal punto di vista della patologia generale, poichè in natura, come si è detto, nei mesi caldi questa varietà di Penicillo è oltremodo scarsa e non le si può perciò attribuire, allora almeno, la importanza patogena grande che ha invece nei mesi freddi. Ma su questo ritorneremo in seguito.

Abbiamo anche provato la tossicità degli estratti penicillari derivati sia dalle patine che dal mais infetto, anche per la via gastro-enterica. Le esperienze furono le seguenti:

1° Cane di Kg. 8. — Si introduce nello stomaco il tossico ottenuto bollendo due patine penicillari di 8 giorni in alcool e riprese con 50 cmc. d'acqua. — Il cane vomita il liquido introdotto dopo $^1/_4$ d' ora.

2° Cane di Kg. 6. — Si introduce nello stomaco il tossico ottenuto da due patine e ripreso con 50 cmc. d'acqua. — Non ha vomito nè diarrea. È abbattuto per qualche ora, poi si rimette.

3° Cane, di Kg. 7. — Si introduce nello stomaco il tossico ottenuto da due patine e ripreso con 40 cmc. di acqua. — Vomita dopo mezz'ora.

4° Cane di Kg. 10. — S'introducono nello stomaco 60 cmc. di estratto di mais avariato con P. gl. (40 cmc. per via peritoneale hanno ucciso un cane in 6 ore). — Non ha vomito nè diarrea. Resta molto abbattuto per alcune ore, poi si rimette.

Per via gastrica adunque, omettendo i casi in cui l' esperienza è stata annullata dal vomito, il potere degli estratti penicillari è decisamente minore. Ciò concorda col fatto che anche la nutrizione con sostanze contenenti il germe produce lesioni intestinali assai meno intense di quelle che si osservano localmente per l' introduzione diretta del germe nell'organismo. Probabilmente la mucosa gastro-enterica offre una barriera difficilmente superabile dal tossico.

Parte II.ª — Questa seconda serie di ricerche, che si possono dire preliminari e che esponiamo integralmente, senza volerne trarre per ora delle conclusioni di indole generale, che sarebbero premature, ha avuto un doppio scopo: di stabilire a

qual parte del germe spetti la parte preponderante nelle manifestazioni tossiche: di studiare i caratteri e la natura del tossico stesso.

Quanto alla prima parte ci limitiamo ad esporre alcune esperienze.

1.ª Tre patine dell' età di 10 giorni vengono sbattute a lungo in acqua che si rinnova per una diecina di volte. Delle spore però si raccolgono su filtro doppio di carta solo quelle dei 3 primi lavaggi (si evita così che entrino frammenti anche minimi di micelo) che formano una poltiglia bruna omogenea. Il micelo appare superiormente bianco-verdastro, inferiormente è sempre rosso mattone: l' esame microscopico dimostra però una certa quantità di spore ancora aderenti.

Si pratica la bollitura separata in alcool a 90°.

*a*) Micelo. L' alcool filtrato caldo è di colore giallo-oro, raffreddandosi lascia depositare dei fiocchi biancastri. Viene evaporato: il residuo (che non dà reazione al percloruro di ferro) vien ripreso con 50 cmc. di acqua distillata.

Topo 1.° — Iniezione di 2 cmc. Dopo 15 minuti dà segni di abbattimento: la depressione aumenta di continuo: dopo 1 ora è incapace di movimenti: dopo 3 ore muore.

Autopsia: Lieve congestione del cavo con scarso essudato.

Nulla agli organi interni.

Topo 2.° — Iniezione di 4 cmc. Quadro analogo al precedente. Muore dopo 3 ore.

Autopsia: Reperto identico.

Topo 3.° — Iniezione di 6 cmc. Dopo mezz' ora è incapace di movimenti: dopo 1 ora e mezza muore.

Autopsia: Reperto come i precedenti.

Cavia. — Iniezione di 10 cmc. Muore con abbattimento progressivo in 10 ore.

Autopsia: Congestione del cavo peritoneale e delle anse con essudato siero sanguinolento. Organi interni iperemici.

*b*) Spore. L' alcool filtrato caldo è di colore giallo un po' più oscuro del precedente: raffreddandosi lascia pure depositare dei fiocchi biancastri minutissimi. Si evapora: il residuo (che non dà reazione al percloruro di ferro) è ripreso con 50 cmc. di acqua.

Topo 1.° — Iniez. di 2 cmc. È un po' depresso per qualche ora ma si rimette.

Topo 2.° — Iniez. di 4 cmc. Depressione progressiva: muore in 24 ore.

Autopsia: Essudato fibrinoso nel cavo peritoneale: nulla agli organi interni.

Topo 3.° — Iniezione di 6 cmc. Presenta forte abbattimento per 24 ore, ma sopravvive.

Cavia. — Iniezione di 10 cmc. Abbattimento forte e progressivo: muore in 44 ore.

Autopsia: Congestione del cavo peritoneale e delle anse intestinali con essudato siero-sanguinolento. Organi interni iperemici.

2.ª Due patine di 10 giorni vengono come le prime sbattute in acqua che si cambia in più volte. Si pratica la bollitura separata del micelo e delle spore.

*a*) Micelo. Il residuo (che non dà reazione col percloruro di ferro) si riprende in 30 cmc. di acqua.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Non presenta fatti notevoli.
id. 2.ª — id. id. 10 id. È un po' abbattuta ma si rimette.

Dopo due giorni alla cavia 1.ª si inietta il residuo dell' estratto, cioè 15 cmc., muore dopo 2 giorni.

*b*) Spore. Il residuo (che non dà reazione col percloruro di ferro) si riprende con 30 cmc. di acqua.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Non presenta fatti notevoli.
id. 2.ª — id. id. 10 id. È un po' abbattuta ma si rimette.

Dopo due giorni alla cavia 1.ª si inietta il residuo dell' estratto, cioè 15 cmc: presenta fatti di abbattimento intenso: ha il pelo arruffato: muore dopo 3 giorni.

Da queste esperienze risulta che la sostanza tossica non è esclusivamente contenuta nella spora, ma si trova anche nel micelo.

Tale fatto è contrario a quanto le recenti ricerche tendevano a far ammettere per gli ifomiceti in genere (le nostre per gli Aspergilli - quelle del Di Pietro per la sua varietà di Penicillo), che cioè la sostanza tossica si localizza esclusivamente nella spora, mancando nel micelo. Le nostre ricerche ci permettono ora di affermare per questi ifomiceti, che tale opinione non può più essere ammessa in senso esclusivo: ma che invece il tossico si forma nel micelo d'onde passa alla spora, la quale ne contiene sempre, proporzionalmente al volume, una quantità assai maggiore.

I risultati più netti ottenuti per questa varietà di Penicillo dal micelo, dipendono dal fatto che in essa la formazione delle spore è sempre relativamente scarsa (vedi la biologia del germe), mentre lo stato di micelo è molto abbondante e che inoltre, mentre si possono ottenere le spore assolutamente senza micelo, questo tiene sempre aderente una certa quantità di spore.

Abbiamo in corso delle ricerche per stabilire in modo preciso il momento in cui si inizia la formazione della sostanza tossica: ma i risultati sono ancora troppi incompleti, perchè possano ora venire pubblicati.

È certo invece che il tossico contenuto nella patina vi si mantiene invariato per lungo tempo: noi abbiamo seminato 12 scatole di Tyndall nello stesso giorno, praticando l' estrazione di due patine per volta, rispettivamente dopo 8, 15, 30, 60 giorni, 6 e 12 mesi. I risultati non presentarono delle differenze di intensità, benchè le patine di 6, e, più ancora, quelle di 12 mesi fossero ridotte ad un sottile strato oltremodo friabile, quasi completamente privo di micelo.

Anche riguardo ai caratteri della sostanza tossica lo studio è appena abbozzato nelle sue linee generali.

Il tossico specifico non si può estrarre mediante la bollitura in acqua: le esperienze parecchie volte ripetute con grandi quantità di materiale, sia patine che mais, in diverse epoche dell' anno, ci diedero sempre risultati negativi, il che è certo in rapporto col fatto che il tossico in acqua è pochissimo solubile. Così pure a nulla approdarono i tentativi con soluzione di $Na_2\,C\,O_3$ 1 $^0/_0$ e con acqua acidulata con $H\,Cl$.

Nemmeno ottenemmo risultati positivi col metodo usato con successo per l' estrazione dei tossici aspergillari: anche prolungando fino a 25 giorni la digestione in alcool a 90°, alla temperatura di 38°, gli estratti non diedero che disturbi transitorî imputabili al trauma operatorio: negativo fu pure l' etere, e ciò è assai singolare, poichè la sostanza tossica è in esso solubilissima.

L' unico metodo che dia risultati costantemente positivi è la bollitura del materiale penicillare in alcool a 90°. La bollitura deve essere prolungata per 30 minuti almeno, ed estrae allora il tossico in modo completo o quasi: è certo, e noi ce ne siamo convinti con alcune prove, che tornando a far bollire in alcool il materiale penicillare dopo una prima estrazione, non si riesce

più ad ottenere del materiale tossico in quantità apprezzabile. L' alcool filtrato a caldo è di colore verde brunastro ed è perfettamente trasparente, col raffreddamento lascia precipitare dei fiocchi biancastri di aspetto mucoso, che non contengono sostanza tossica. Infatti se si filtra l' alcool raffreddato attraverso a carta bibula, si disciolgono i fiocchi rimasti sul filtro in acqua e si iniettano ad una cavia o ad altro animale, non si hanno fenomeni apprezzabili, mentre il residuo del soluto alcoolico limpido produce i fenomeni caratteristici. Anche per questo abbiamo fatto parecchie esperienze, che omettiamo per brevità.

L'alcool evaporato a dolce calore lascia un residuo di colore caffè-giallastro, di odore aromatico con dei ricordi di muffa, di sapore amaro non spiacevole, che è pochissimo solubile in acqua fredda, un po' più nella calda in cui si forma un' emulsione finamente divisa ed a cui dà una reazione spiccatamente acida. È invece solubilissimo in alcool ed in etere. Con questo è anzi possibile separarlo da tutta o da buona parte delle sostanze eterogenee. Prova ne sia la seguente esperienza:

Due patine dell' età di 15 giorni vengono bollite in alcool che si filtra e si evapora. Il residuo si sbatte a lungo con etere che si decanta completamente. Rimane allora un residuo solido che viene emulsionato in 40 cmc. di acqua distillata ed iniettato ad un cane del peso di Kg. 6 circa. Questo non ha vomito, non presenta disturbi notevoli. L' etere viene sbattuto a lungo con soluzione di $Na_2\ CO_3$ 1 %$_0$, che si rinnova 3 volte, decantato ed evaporato. Il residuo secco, che ha un colore bruno-caffè, viene emulsionato in 20 cmc. di acqua distillata ed iniettato ad un cane di 7 Kg. Dopo mezz' ora cominciano segni di abbattimento forte e di depressione: il cane ha prima vomito intenso poi conati a vuoto: la testa ciondoloni, rilasciamento generale. Muore dopo 5 ore con abbattimento progressivo.

Autopsia: Congestione del cavo peritoneale e delle anse intestinali con abbondante essudato siero-sanguinolento: emorragie nel grande omento. Congestione epatica dei polmoni e della pia cerebrale: minore assai al midollo.

Questa esperienza fu fatta un' altra volta con risultati identici: e ciò è tanto più singolare in quanto colla digestione in etere noi non siamo mai riusciti ad avere risultati positivi. Le temperature anche elevate ed agenti per molto tempo non alterano il potere tossico: i nostri soluti acquosi furono sempre sterilizzati mediante la bollitura, che per prova si prolungò talvolta fino a mezz' ora, senza pregiudizio dell' attività specifica.

Se dopo aver bollito le patine e filtrato l' alcool, si lascia questo a sè per lungo tempo, non si ha apprezzabile diminuzione del potere tossico: dopo un anno l' estratto di due patine si dimostrò completamente attivo, uccidendo un cane in 16 ore. Se invece si evapora l' alcool e si lascia a sè il residuo ripreso con acqua, il potere tossico dopo un po' di tempo scompare. Un fatto simile noi abbiamo verificato pei tossici aspergillari.

Una cosa che possiamo affermare recisamente, e su questo richiamiamo l' attenzione in modo speciale, è che la sostanza di cui abbiamo descritto le proprietà patogene, non ha assolutamente nulla a che fare coi composti fenolici ai quali il Gosio in antiche e recenti pubblicazioni ha attribuito tanta importanza per la genesi della pellagra. Questa varietà il cui potere tossico è indubbiamente oltremodo elevato, appartiene a quelle non fenoliche, che il Gosio stesso ha ammesso esistere in natura e che quindi, secondo le sue idee, dovrebbero essere dotate di minore attività. Noi infatti non abbiamo mai nè dalle patine pure, nè dal liquido di Raulin, in cui il Penicillo aveva vegetato, nè dal mais infetto, potuto ottenere la minima traccia di reazione verde o verdastra o violacea col percloruro di ferro. Le ricerche praticate attenendosi strettamente alle regole indicate dal Gosio stesso, con materiale anche molto abbondante, in ogni epoca dell' anno, diedero risultati, con questa varietà di Penicillo, costantemente negativi.

Del resto ad escludere che si trattasse di corpi fenolici bastava la differenza assoluta dei sintomi offerti dagli animali (anche i topi) iniettati coi tossici penicillari, con quelli descritti da Gosio e bastava ancora il fatto che la digestione in alcool a temperatura di 38° non-estrae i tossici caratteristici, mentre per i fenoli basta l' estrazione in alcool per poche ore. Si aggiunga a questo che la sostanza tossica da noi isolata non si trova nel liquido colturale. Infatti questo è tollerato dagli animali anche in grandi quantità (fino a 15 cmc. in una cavia) e l' estratto etereo del liquido colturale, su cui avevano vegetato 3 patine (le quali avevano dato risultato positivo in un cane - esp. 6.ª) non ha ucciso una cavia di 400 gr.

I composti fenolici di Gosio, prodotto specifico del ricambio materiale del Penicillo, si trovano nell' ambiente nutritivo, nel quale anzi non si formano se mancano certi elementi. La

sostanza tossica isolabile da questo germe è invece inerente al germe stesso come organismo: e noi abbiamo dimostrato appunto che si trova tanto nel micelo quanto nella spora: è un prodotto della vita del germe, ma insito alla costituzione del germe stesso in modo così tenace, che solo l' azione della bollitura in alcool riesce a separarlo. Esso è molto più resistente del tossico aspergillare e di quello dell' altra varietà di Penicillo.

### Riassunto delle esperienze sulla varietà *A*.

I risultati delle esperienze riferite nei precedenti capitoli concordano nel dimostrare in questa varietà di Penicillo glauco un potere patogeno, manifestantesi con caratteri identici qualunque sia il modo con cui la sostanza tossica entra nell' organismo, sia ancora unita al germe, per via endoperitoneale, endovenosa o gastro-intestinale, sia isolata artificialmente ed iniettata in soluto acquoso.

Costantemente dominano il quadro fenomenico gravi fatti di abbattimento e di depressione generale con rilasciamento muscolare. Il quadro naturalmente offre delle variazioni a seconda della via di ingresso, essendo specialmente acuti i fenomeni, il che ben si comprende, quando si iniettano direttamente i tossici già isolati del germe.

Dal punto di vista della pellagra sono specialmente interessanti i fatti prodotti dalla nutrizione con mais o con polenta penicillare: la morte degli animali si è avuta in periodi di tempo di poco superiori a quelli colle sostanze infette con *Aspergillus fumigatus*, prova questa dell' alto potere tossico che spetta a questo germe. Noi analizzeremo in seguito più a lungo l' importanza sua per la genesi della pellagra: non possiamo però non far notare subito come si tratti sempre e solo di fatti di intossicazione pura per il tossico resosi libero nel tubo gastro-enterico: a noi infatti non è mai riuscito di dimostrare l' ingresso in circolo delle spore penicillari, a differenza di quanto si ha per l' *Aspergillus fumigatus*.

I risultati di queste esperienze mettono in luce nuova il valore patogeno dei Penicilli ed hanno per la patologia generale una importanza notevole. A nessuno infatti era riuscito finora a dimostrare in essi un potere tossico; i risultati recenti del Di Pietro si riferiscono ad un' altra varietà

con caratteri patogeni completamente diverso: ad altre varietà di Penicillo egli aveva negato qualunque potere tossico.

Le nostre ricerche, per quanto appena abbozzate, ci permettono di affermare che anche altre varietà di Penicillo posseggono un potere analogo: è quindi un campo nuovo ed importante aperto alle indagini scientifiche.

Come si è detto, si tratta sempre di fatti di intossicazione: e questa è dovuta esclusivamente al germe, sia al micelo che alla spora. Noi siamo obbligati a modificare il concetto che, riguardo agli ifomiceti, avevano introdotto le ricerche nostre e quelle del Di Pietro, che cioè alla spora solo spettasse un'importanza patogena. E poichè è specialmente nelle stagioni fredde che esso prolifera più rigogliosamente e si trova in maggiore quantità negli ambienti, il suo potere patogeno deve specialmente essere considerato in rapporto a quelle epoche. Di ciò parleremo più avanti.

Il substrato su cui il germe ha proliferato non modifica i caratteri specifici del tossico: non vogliamo certo negare che le alterazioni del materiale nutritivo o che i prodotti del ricambio materiale possano avere dal canto loro un' importanza patogenica: certo essa è lieve in confronto a quella del germe. In ogni caso i composti fenolici non entrano in scena: noi non abbiamo mai potuto dimostrarli nè nel germe, nè nel terreno nutritizio.

Una parola intorno alle lesioni anatomo-patologiche. Il germe introdotto in emulsione in dosi non mortali viene rapidamente eliminato dall' organismo: la fagocitosi è oltremodo attiva e tanto le spore che il micelo vengono assaliti dai leucociti ed asportati: i frammenti più grossi vengono incapsulati da tessuto connettivo sottile senza sostanza caseosa.

La cariossidi od i frammenti di patina, in dosi non mortali, vengono pure incapsulati da sottile tessuto connettivo, senza traccie di sostanza caseosa. Una reazione locale intensa si ha solo inoculando quantità che producano rapidamente la morte: allora si ha sempre una forte congestione del cavo peritoneale con essudato siero-sanguinolento.

La nutrizione con mais o polenta penicillare produce fatti notevoli solo a carico dello stomaco e delle prime porzioni dell' intestino, ed anche qui solo nei casi in cui la morte avviene rapidamente (cavie nutrite con mais penicillare): quando la morte avviene con fatti cronici (conigli e cani) le lesioni gastro-

enteriche sono sempre lievissime. Negli altri organi mancano sempre fatti infiammatorii, il che è certamente in rapporto col mancato ingresso in circolo delle spore.

Infine specialmente notevoli sono i fenomeni che succedono alla iniezione dei tossici nel cavo peritoneale. Si ha sempre una peritonite emorragica insorgente con una rapidità eccezionale: già dopo tre o quattro ore si ha una congestione fortissima del cavo peritoneale e delle anse intestinali, con emorragie puntiformi del grande omento ed abbondante essudato siero-sanguinolento. A questa si associa sempre la congestione del fegato, dei polmoni e della pia meninge cerebrale.

Le lesioni dell' asse cerebro spinale, molto importanti per i rapporti colle lesioni della pellagra, saranno descritte in un lavoro a parte: possiamo già affermare che mancano sempre le degenerazioni primarie che si hanno costantemente coi tossici aspergillari [18]. Anche qui adunque si ha un comportamento caratteristico.

A questo germe gli animali reagiscono in modo diverso: pei tossici, i più sensibili sembrano essere i cani, poi le cavie e i topi: i conigli invece sono oltremodo resistenti; essi si comportano di fronte a questa varietà come di fronte all' altro Penicillo ed agli aspergilli. Per il germe introdotto direttamente nell' organismo, noi abbiamo avuto risultati positivi solo nelle cavie, che anche per la nutrizione si sono dimostrate meno resistenti.

## Varietà *B* del Penicillo glauco.

### I. — *Caratteri morfologici e colturali.*

Questa varietà di Penicillo presenta parecchi caratteri differenziali dalla varietà precedente. Si isola molto frequentemente dagli ambienti malsani durante i mesi caldi, nei quali essa prevale sull' altra: è invece assai scarsa o manca affatto nelle stagioni fredde. Nelle epoche propizie ha uno sviluppo molto più rapido della varietà precedente.

Nelle scatole di Petri col fondo coperto da uno strato di carta bibula inumidita col liquido di Raulin ed esposte in certi ambienti, questa varietà di Penicillo si sviluppa dando rapidamente delle grosse colonie, in cui già al 2° giorno si inizia la sporificazione e che si distinguono pel fatto che la superficie delle spore si presenta di un colore verde-bluastro chiaro, ben

diverso dal verde scuro delle altre colonie di *Penicillum glaucum*, le quali sono anche più piccole e si sviluppano più lentamente. Tali caratteri si mantengono e spiccano anche più facendo le colture pure in liquido di Raulin: si nota che già dopo alcune ore (15-18) si cominciano a formare delle colonie di un bianco latteo, che crescono assai rapidamente in larghezza e dopo 24-28 ore di solito hanno coperto la superficie del liquido: è un fatto costante che non si ha mai una patina unita o con larghe pieghe come l' altra varietà, ma ogni colonia forma alcunchè di distinto dalle altre, alle quali si unisce intimamente solo più tardi alla faccia inferiore della patina stessa. Verso la metà del secondo giorno incomincia la sporificazione, che dà alla patina un aspetto verde-chiaro con tanti punti più oscuri al centro delle colonie primitive: il colore si va facendo di mano in mano più intenso col completarsi della sporificazione ed al 3.° giorno tutta la patina ha un bel colore verde chiaro leggermente bluastro. Successivamente questo diventa più intenso: al 6°-7° giorno è verde, poi assume una *nuance* grigia, che si fa sempre più spiccata. Verso il 12.° giorno, epoca in cui la patina si può considerare completa, il colore è grigio: la superficie sporificante ha un aspetto caratteristico, in quanto è disseminata di tante piccole escrescente rotonde corrispondenti alle colonie primitive, che superiormente si presentano così in certo modo ancora distinte, e da molte delle quali fuoriescono dei ciuffetti di micelo di color bianco latteo.

La faccia inferiore, prima di un bianco latteo come la superiore, si modifica alquanto successivamente: il colore diventa bianco-cretaceo. In nessun momento dello sviluppo si ha anche solo un accenno alla colorazione gialla intensa, caratteristica dell' altra varietà. Il liquido colturale si modifica pure, diventa di colore un po' scuro ed a reazione neutra o leggermente alcalina: il colore è sempre assai più chiaro di quello in cui si è sviluppata la varietà *A*.

Come abbiamo detto, altre varietà di Penicillo, sia per i caratteri colturali che per il potere patogeno sono analoghe a questa. Così nelle stagioni calde abbiamo trovata molto diffusa un'altra varietà, pure a sviluppo molto rapido, la quale presenta questo fatto caratteristico, che al secondo giorno le colonie coltivate su una carta bibula imbevuta nel liquido di Raulin, hanno un alone giallo chiaro, il quale va diminuendo quando si inizia la sporificazione

per poi scomparire del tutto. La faccia inferiore delle colonie, prima bianca, diventa lievemente rossiccia: ma il colore non ha mai l' intensità della varietà *A*. Superiormente la patina non differisce nell' aspetto dalla varietà *B*. Il potere patogeno pare identico: lo studio di essa non è ancora completo: ci basti quindi questo breve cenno.

## II. — *Potere patogeno.*

Come per l' altra varietà di Penicillo, abbiamo eseguito tre serie di esperienze, cioè:

1.° Inoculazione diretta del germe nell' organismo.

2.° Nutrizione con polenta o con mais infetto.

3.° Estrazione dei tossici ed iniezione agli animali.

Saremo molto brevi nell' esposizione di queste ricerche, perchè il metodo è stato sempre identico a quello usato per la varietà *A*.

1.° Introduzione diretta nell' organismo.

È stata praticata per via endovenosa e per la peritoneale.

*a)* via endovenosa.

Anche qui si praticò un' unica esperienza. — Dalla superficie di una patina dell' età di 7 giorni, bene sporificata, si asporta il più possibile di spore che si emulsionano in 30 cmc. di acqua distillata. Si ha un liquido verdastro, semitrasparente, omogeneo.

Cane di Kg. 6. — Si iniettano nella vena femorale destra 20 cmc. dell' emulsione. Già dopo qualche minuto insorgono tremori muscolari e fatti spasmodici non molto intensi: il cane cammina con difficoltà e pare incerto nel posare le zampe. Dopo una mezz' ora si sdraia sul suolo, cammina solo se stimolato energicamente: l' andatura ha carattere nettamente atassico-spastico. Persistono i tremori che insorgono accessualmente. Dopo 12 ore i fatti accennano a diminuire: dopo 24 ore non si ha più traccia di fatti neuro-muscolari, il cane però è completamente rimesso solo dopo 2 giorni.

Si è avuto qui un quadro caratteristico ben diverso da quello ottenuto coll' altra varietà. È singolare la rapidità con cui sono insorti i fenomeni neuro-muscolari, che già si iniziarono dopo pochi minuti. Notiamo che la quantità di materiale iniettato è

stata uguale a quella della stessa esperienza coll' altra varietà di Penicillo e che, nonostante l' evidenza dei fenomeni, qui non si è avuta la morte dell' animale. Questo prova, e la riconferma si vedrà nelle esperienze successive, che in realtà il potere patogeno di questa varietà, benchè più facile a riscontrarsi per l' evidenza dei sintomi, è minore.

*b*) via peritoneale.

Si eseguiscono anche qui 4 serie di esperienze.

*a*) Iniezione di emulsioni ricavate da patine penicillari.

1.° (*Marzo*). — Dalla patina che copre uniformenente il fondo di una scatola di Petri del diametro di 12 cmc. si raschia con una spatola il più possibile di spore, che si emulsionano in 20 cmc. di acqua distillata.

Cavia del peso di gr. 520. — Iniezione endoperitoneale di 10 cmc. - Dopo 15 minuti cominciano dei fatti neuromuscolari, caratterizzati da tremori generali accessuali, che imprimono al corpo un movimento ondulatorio e sussultorio in senso antero-posteriore. Se l' accesso insorge durante il cammino, l' animale è obbligato a fermarsi per il tempo che durano i fatti accennati. Dopo un po' di tempo questi fatti si vanno accentuando, si aggiunge uno stato spasmodico della muscolatura, specialmente del treno posteriore, per il che il cammino diviene ondeggiante. Dopo due ore la cavia è rovesciata sopra un fianco in preda a continui movimenti spasmodici, non molto forti, degli arti: a tratti ha dei tremori generali. L' animale muore dopo 24 ore: la morte è preceduta da un periodo di rilasciamento generale.

Autopsia: Congestione intensa del cavo peritoneale e delle anse intestinali, con abbondante essudato siero-sanguinolento. L' emulsione in parte è sparsa nel cavo peritoneale, in parte è aderente alle anse per un lieve essudato fibrinoso. Manca la reazione leucocitaria.

2.° (*Aprile*). — Da una patina che copre il fondo di una scatola di Petri di 12 cmc. di diametro si asporta il più possibile di spore che si emulsionano in 20 cmc. di acqua distillata.

Cavia. — Iniezione di 10 cmc. Dopo un $^1/_4$ d'ora incominciano tremori muscolari accessuali che, come nell'esperienza precedente, danno alla cavia un movimento ondulatorio-sussultorio in senso antero-posteriore. Dopo alcune ore si hanno fenomeni spasmodici degli arti: il cammino diventa traballante, poi l' animale si rovescia sopra un fianco. Muore dopo 42 ore.

Autopsia: Congestione intensa del cavo peritoneale e delle anse intestinali. I frammenti dell' emulsione aderiscono alla superficie degli organi addominali, non molto congesti, per un lieve essudato fibrinoso. Il fegato presenta una notevole degenerazione grassa. I polmoni sono iperemici.

3.° (*Maggio*) — 20 cmq. di patina vengono emulsionati in 30 cmc. di acqua distillata. I frammenti un po' grossi vengono eliminati filtrando attraverso ad una reticella metallica a maglie strette.

Cane di Kg. 7 circa. — Iniezione di 20 cmc. di emulsione. - Dopo $^1/_4$ d' ora vomito. Dopo mezz' ora insorgono dei tremori muscolari intensi accessuali: insorge pure uno stato spasmodico della muscolatura per cui il cammino si fà difficile ed inceppato: l' andatura è atassico-spastica e traballante. Mancano fatti convulsivi e sussulti. Tale stato dura 20 ore circa, poi va gradatamente scemando residuando della debolezza per qualche giorno.

Coniglio di gr. 2500. — Iniezione di 10 cmc. - Abbattimento notevol per qualche ora. Nessun fatto muscolare analogo a quello che si ha nei cani e nelle cavie.

Coniglio di gr. 2000. — Iniezione di 20 cmc. di emulsione molto densa. Abbattimento notevole per qualche ora. Nessun fatto neuromuscolare.

4.° (*Giugno*) — 30 gr. di patina liberata del liquido colturale, vengono emulsionati in 50 cmc. di acqua distillata.

Si filtra attraverso a rete metallica sterilizzata a maglie sottili che trattiene i frammenti un po' grossi dell' emulsione.

Coniglio. — Iniez. di 20 cmc. Non presenta fatti neuromuscolari notevoli: diminuisce di peso per 3 giorni, poi si rimette. Viene ucciso, mentre sta bene, dopo 14 giorni.

Autopsia: Gli organi interni non presentano fatti degni di nota. Sul mesentere ed alla superficie dell' utero e degli ovidotti si notano numerosi corpiciuoli rotondi, di aspetto ialino, che schiacciati dimostrano la presenza di elementi dell' emulsione.

Manca ogni traccia di reazione leucocitaria.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. della stessa emulsione. Non presenta fatti neuromuscolari: diminuisce di peso per 3 giorni, poi si rimette.

Cavia 2.ª — Iniezione di 5 cmc. della stessa emulsione. Non presenta fatti neuromuscolari: diminuisce di peso per 3 giorni, poi si rimette.

Dopo 5 giorni si riiniettano a ciascuna 10 cmc. di emulsione fatta nelle stesse proporzioni.

La cavia prima dopo mezz' ora presenta i caratteristici tremori con movimento ondulatorio-sussultorio in senso antero-posteriore a cui succede paresi spastica. Tali fatti durano due giorni, poi l' animale si rimette. Viene uccisa dopo 8 giorni.

Autopsia: Alla superficie del fegato, della milza, dei reni, dell' intestino e del mesentere si osservano numerosi noduli di aspetto ialino contenenti particelle dell' emulsione. Manca però ogni traccia di reazione leucocitaria. Gli organi internamente hanno aspetto normale.

La cavia seconda presenta fatti neuromuscolari rapidi ed oltremodo intensi: muore dopo 3 ore.

Autopsia: Congestione fortissima del cavo peritoneale a delle anse intestinali con emorragie puntiformi ed essudato emorragico. Fegato con degenerazione grassa incipiente: reni pallidi: milza ingrossata, friabile. Il grande omento ha la forma di un grosso cordone trasversale enormemente congesto: intensamente iperemici sono pure il mesentere ed i polmoni.

5.° Una patina coltivata in scatole Petri (12 cm. diametro) viene emulsionata in 20 cmc. di acqua.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo mezz' ora è completo il quadro classico che dura circa 20 ore. L' animale sopravvive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo 20 minuti è completo il quadro con fenomeni spasmodici intensi. La cavia muore dopo 15 ore.

Autopsia: Congestione mediocre del cavo peritoneale e delle anse con essudato sieroso. Fegato congesto. Nulla agli altri organi.

Anche coll'iniezione endoperitoneale di emulsioni si è avuto negli animali un quadro caratterizzato da fatti di esaltata attività neuromuscolare, analogo a quanto si ha pei tossici aspergillari. È singolare il fatto della refrattarietà dei conigli, quantunque siano state inoculate quantità rilevanti del germe e che è identico a quanto si è osservato per l' altra varietà di Penicillo.

β) Emulsioni fatte con cariossidi infette.

50 cariossidi di mais penicillare infetto da circa un mese vengono emulsionate in 20 cmc. di acqua distillata. (Le cariossidi sono coperte alla superficie da un sottilissimo strato di spore e presentano delle chiazze piuttosto grosse specialmente verso l'ilo: l'interno è pressochè inalterato).

Cavia 1.ª — Iniezione di 10 cmc. Non presenta fatti notevoli. Viene uccisa dopo 8 giorni, mentre stava bene.

Autopsia: Nessun fatto di irritazione peritoneale: i frammenti più grossi dell' emulsione sono racchiusi da un lievissimo strato di sostanza caseosa che forma qualche chiazza alla superficie del fegato e della milza.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Non presenta fatti notevoli. Viene uccisa dopo 8 giorni, mentre sta benissimo.

Autopsia: Reperto identico al precedente.

Si è avuto cioè un comportamento perfettamente uguale a quello presentato dall' altra varietà.

*γ*) Inoculazione di patine.

1° Cavia di gr. 370. — Si inoculano nel peritoneo 5 cmc. di patina penicillare di sette giorni, ricchissima di spore. Dopo 5 minuti incominciano esagerazione dei riflessi e tremori muscolari che diventano sempre più intensi: dopo 3 ore circa il cammino si fa ondeggiante. Dopo 10 ore la cavia è incapace di eseguire movimenti volontari. Muore dopo 22 ore.

Autopsia: Le anse intestinali ed il peritoneo sono mediocremente congesti: nel cavo peritoneale si nota del liquido sieroso leggermente tinto in rosso: attorno alla patina vi è dell' essudato fibrinoso

2.° Cavia di gr. 530. — Si inoculano 10 cmc. di patina. Dopo 5 minuti si ha esagerazione dei riflessi e tremori intensi, poi andatura ondeggiante. La cavia muore dopo 18 ore.

Autopsia: Congestione del cavo con essudato sieroso: lieve velamento fibrinoso attorno alla patina.

I risultati positivi, dopo quanto si è avuto colle emulsioni, non possono sorprendere: il quadro è stato perfettamente identico.

*δ*) Inoculazione endoperitoneale di cariossidi infette.

1.° Coniglio di gr. 1885. — Si inoculano nel peritoneo 5 cariossidi infette di recente (15 giorni). Le cariossidi sono uniformemente coperte da uno spesso strato di spore con scarso micelo. Manca affatto ogni segno di reazione neuromuscolare. Il peso discende in due giorni a 1810, poi risale. Dopo 7 giorni il coniglio pesa gr. 1995. Viene ucciso.

Autopsia: Le cariossidi sono contenute in una sacca di sottile tessuto connettivo con lievissima quantità di sostanza caseosa. Nulla di notevole agli altri organi.

Esame colturale. Le cariossidi seminate in liquido di Raulin dopo 24 ore danno luogo ad abbondante sviluppo del germe.

2.° Coniglio di gr. 2200. — Si inoculano nel peritoneo 8 cariossidi infette di recente (15 giorni). Nessun fatto neuromuscolare. L' animale discende a 2030 in 2 giorni, poi si rimette bene. Tuttavia risale alla norma solo dopo 25 giorni. Viene ucciso dopo 1 mese.

Autopsia: Le cariossidi sono ravvolte in una sacca contenente grande quantità di sostanza cremosa densa. (In questo caso nell' operazione si era lesa una ghiandola mammaria che era in contatto e comunicava col punto dove si erano introdotte le cariossidi. Qui pertanto si è trattato di fatti d' infezione esterna). Nulla di notevole negli altri organi.

Esame colturale. Dalle cariossidi seminate in liquido di Raulin si sviluppa il germe dopo 3 giorni.

3.° Cavia di gr. 520. — Si inoculano 2 cariossidi infette di recente (15 giorni). Nessun fatto neuro-muscolare. In due giorni discende a 480, poi ritorna rapidamente alla norma. Viene uccisa dopo 7 giorni.

Autopsia: Cariossidi contenute in una sacca di sottile tessuto connettivo con scarsissima quantità di sostanza caseosa. Nulla di notevole agli altri organi.

Esame colturale. Dalle cariossidi seminate in liquido di Raulin dopo 24 ore si sviluppa il germe in grande quantità.

4.° Cavia di gr. 550 — Si inoculano 3 cariossidi avariate di recente. Nessun fatto neuromuscolare. Il peso discende in 4 giorni a 525, poi risale. Viene uccisa dopo 1 mese, pesando gr. 650.

Autopsia: Le cariossidi sono ravvolte da un sottile strato di tessuto connettivo. Nulla agli altri organi.

Esame colturale. Dalle cariossidi si sviluppa il germe dopo 3 giorni.

5.° Cavia di gr. 720. — Si inoculano 8 cariossidi avariate da 40 giorni circa. Non presenta fatti neuromuscolari degni di nota. Il peso però diminuisce alquanto. Viene uccisa dopo 8 giorni pesando 635 gr.

Autopsia: Nessun fatto irritativo nelle anse intestinali e nel peritoneo: le cariossidi sono ravvolte da sottile tessuto connettivo senza sostanza caseosa: gli organi interni hanno aspetto normale.

6.° Cavia di gr. 470. — Si inoculano 10 cariossidi avariate da 40 giorni circa. Non presenta fatti neuromuscolari degni di nota: il peso diminuisce per 5 giorni, poi risale. Viene uccisa dopo 8 giorni.

Autopsia: Cariossidi ravvolte da sottile tessuto connettivo, pressochè senza sostanza caseosa. Anse intestinali, peritoneo, organi interni di aspetto normale.

In nessun modo adunque, e le esperienze sono state parecchie, è stato possibile avere dalle cariossidi un effetto tossico: ciò concorda colle esperienze fatte mediante le emulsioni e, per questa varietà, concorda pure coi risultati della nutrizione con mais infetto che ci ha dato risultati negativi. Come per l' altra varietà di Penicillo, il perchè di questo fatto ci sfugge completamente.

Dal complesso delle esperienze praticate mediante l' introduzione diretta del germe nell' organismo animale, risulta che questa varietà di Penicillo è dotata di proprietà tossiche specifiche, affatto diverse da quelle dell' altra varietà. Invece dei fatti a carattere depressivo, si sono infatti avuti fenomeni di ipereccitabilità neuromuscolare, caratterizzati da tremori con

atassia e stato spasmodico non molto forte della muscolatura, analoghi a quelli descritti dal Di Pietro per la sua varietà. Probabilmente si tratta dello stesso germe.

All' inoculazione hanno sempre reagito bene le cavie ed i cani: i conigli, invece, si sono mostrati refrattarii, fatto che si è ripetuto per l' alimentazione con polenta penicillare.

La quantità di germe neccessaria per produrre fenomeni evidenti è sempre piuttosto considerevole: le dosi mortali poi debbono essere molto forti: basti, riguardo a ciò, notare il fatto che delle esperienze fatte iniettando emulsioni ricavate da patine penicillari, la 5.ª delle varietà *A* e la 4.ª della varietà *B* furono praticate tenendosi scrupolosamente nelle stesse condizioni sperimentali, cioè usando quantità uguali di patine della stessa età emulsionate nella stessa quantità d' acqua. Ora le cavie inoculate colla prima varietà sono morte acutamente, quelle inoculate colla seconda non hanno nemmeno presentato fatti neuromuscolari, che si ebbero, senza produrre la morte, solo con quantità doppia di germe. Lo stesso fatto è provato dai risultati avuti colla iniezione endovenosa, pure praticata in identiche condizioni di esperimento: il cane inoculato colla prima varietà è morto in poche ore, il cane inoculato colla seconda, pur avendo presentato i fatti neuromuscolari caratteristici, è sopravvissuto. Se poi il potere patogeno è confrontato con quello dell'*Aspergillus fumigatus*, le differenze sono di gran lunga più evidenti, poichè per questo bastano quantità molto minori (l' emulsione di due cariossidi) a produrre la morte di una cavia.

È anche qui singolare, e per noi inesplicato, il fatto dell'assoluta mancanza di tossicità del germe coltivato sulla cariosside maidica: nè le emulsioni pur molto dense, nè le cariossidi inoculate in grande numero (fino a 10 in una cavia) ci hanno dato fenomeni degni di nota. Come per l'altra varietà di germe, sono in corso delle ricerche per spiegare questo singolare comportamento.

Quanto alle lesioni anatomo-patologiche, noi troviamo delle reazioni locali molto meno intense che per l' altra varietà: per le emulsioni la fagocitosi interviene rapidamente ad eliminare il germe: per le patine e le cariossidi si ha un incapsulamento per mezzo di un lieve strato di tessuto connettivo, senza sostanza caseosa. Manca affatto la intensa reazione che si osserva per l' iniezione di emulsioni o di cariossidi aspergillari.

2.° — Effetti della nutrizione.

Si sono fatte due serie di esperienze: *a*) nutrendo le cavie con mais penicillare; *b*) mescolando alla polenta delle patine bene sporificate e somministrandole a cavie ed a conigli, od introducendo le patine mediante sonda nello stomaco ai cani.

*a)* nutrizione con mais penicillare.

Tre cavie vengono messe a nutrizione con mais avariato di recente. Non si è mai somministrato mais che fosse stato infetto da più di 45 giorni, quindi le cariossidi si presentavano con un sottile strato di spore qua e là addensate in chiazze specialmente in vicinanza dell'ilo: l'interno era pressochè intatto.

1.° Una cavia muore dopo 28 giorni senza mai aver presentato fatti neuromuscolari degni di nota. È molto dimagrata.

All' autopsia presenta una lievissima congestione del tenue: nulla di notevole agli altri organi.

2.° Una cavia muore dopo 45 giorni senza aver mai presentato fatti neuromuscolari degni di nota. È pure molto deperita.

All' autopsia presenta anch' essa una lievissima iperemia intestinale, senza fatti degni di nota agli altri organi.

3.° L' altra cavia dopo 2 mesi di nutrizione con mais aspergillare stava ancora bene.

Quindi anche per la via gastro-intestinale il mais infetto con questa varietà di germe è tossico solo in grado lievissimo.

*b*) Nutrizione con polenta mescolata a patine penicillari.

Si sono praticate le esperienze mescolando patine bene sporificate del germe, di età varia tra i 12 ed i 20 giorni, in proporzione costante, cioè due patine a circa 1 Kg. di polenta. Questa veniva spappolata ed impastata parecchie volte in modo da avere una divisione uniforme del materiale. Si sperimentò sopra cavie e conigli.

*α*) Cavie.

Cavia 1.ª Deperisce rapidamente e progressivamente: dopo 3 giorni ha il pelo arruffato che cade con grande facilità. Non presenta fatti neuromuscolari. Muore dopo 7 giorni.

Autopsia: Congestione intensa dell' intestino, del fegato, dei reni e della pia cerebrale. La milza è pallida, di grandezza normale. Non c' è essudato peritoneale.

Esame colturale: Peritoneo, reni, milza, fegato: negativo.

Cavia 2.ª — Deperisce, meno però della precedente: dopo alcuni giorni ha il pelo arruffato, che cade facilmente. Al 14.° giorno di nutrizione si notano dei fatti neuromuscolari di notevole intensità e caratterizzati da intensi tremori che scuotono tutto il corpo specialmente in senso antero-posteriore. Tali tremori insorgono accessualmente sia quando l'animale è tranquillo che quando cammina nella gabbia; in questo caso l' animale si arresta per il tempo che dura l' accesso. Il quadro persiste invariato fino alla morte, che avviene al 17.° giorno.

Autopsia: Lieve congestione dello stomaco e dell' intestino tenue (ad un dipresso come col Penicillo comune). Nulla agli altri organi.

Esame colturale: Fegato, milza, rene, peritoneo, ghiandole peritoneali: negativo.

Cavia 3.ª — Deperimento progressivo: dopo alcuni giorni ha il pelo arruffato. Al 9.° giorno si manifestano fatti neuromuscolari identici a quelli descritti sopra, a cui si aggiunge, dopo 3 giorni, un lieve stato spasmodico degli arti che rende un po' traballante il cammino. Il quadro persiste invariato fino alla morte che avviene dopo 18 giorni.

Autopsia: Lievissima iperemia gastrica. Nulla agli altri organi.

Esame colturale: Fegato, milza, ghiandole mesenteriche: negativo.

Cavia 4.ª — Muore con rapido deperimento dopo 5 giorni: nessun fatto neuromuscolare.

Autopsia: Congestione intestinale intensa: lieve essudato fibrinoso nel cavo peritoneale: congestione e degenerazione grassa iniziale nel fegato e nei reni. Polmoni e cervello fortemente iperemiei.

Esame colturale: Rene, fegato, milza: negativo.

Essudato peritoneale: in due provette negativo: in due provette scarso sviluppo.

Cavia 5.ª Deperisce rapidamente. Dopo 5 giorni insorgono tremori identici a quelli delle cavie precedenti e lieve stato spasmodico degli arti. Muore dopo 9 giorni.

Autopsia: Lieve congestione intestinale. Fegato e reni pallidi; gli altri organi normali.

Esame colturale: Essudato peritoneale e fegato - negativo.

*β)* Conigli.

Coniglio 1.° — Muore deperendo notevolmente e senza fatti neuromuscolari dopo 19 giorni.

Autopsia: Non presenta fatti degni di nota. L' intestino non è congesto.

Esame colturale: Fegato e milza: negativo.

Coniglio 2.° — Muore con rapido deperimento in 15 giorni. Nessun fatto neuromuscolare.

Autopsia: Lieve iperemia del tenue: nulla di notevole agli altri organi.

Esame colturale: Rene, fegato, essudato peritoneale: negativo. Milza: positivo in una provetta: negativo in un' altra.

Coniglio 3.° — Muore dopo 4 giorni senza aver presentato fatti neuro-muscolari. È un po' diminuito di peso.

Autopsia: Coccidiosi. Forte congestione epatica: reni pallidi: nulla ai polmoni ed alla milza: lieve essudato peritoneale.

Esame colturale: Rene, fegato, milza, essudato peritoneale: negativo.

Nei cani è stato impossibile fare l' alimentazione con cibi a cui erano commiste le patine di questa varietà di Penicillo: anche lasciati a digiuno per lungo tempo rifiutavano ostinatamente di mangiarne. Per questo si è ricorso all' introduzione nello stomaco, mediante la sonda esofagea, di emulsioni fatte con patine bene sporificate.

1.° Cane grigio, pesante 15 Kg. — Si introduce nello stomaco, dopo un digiuno di 24 ore, l' emulsione fatta con 15 gr. di patina penicillare bene sporificata, di 15 giorni. Dopo 15 minuti cominciano fatti spasmodici di tutta la muscolatura: il cane cammina colle gambe leggermente divaricate, rigide, portando in avanti un arto dopo l' altro lentamente e con incertezza come se temesse di cadere: il cammino è reso anche più incerto dal tremore generale, talvolta anzi l' equilibrio manca ed il cane o cade per rialzarsi a fatica od è costretto ad una serie precipitosa di passi per rimettersi in equilibrio. Si ha il vero tipo dell' andatura atassico spastica coll' aggiunta del tremore. Il capo ed il collo sono leggermente curvi in basso: dalla bocca colla enorme quantità di saliva. Non si hanno fatti accessuali come nelle cavie. Il quadro dura in tal modo per $^3/_4$ d' ora, poi l' animale cade su un fianco e rimane lì in preda a tremori generali ed agitando gli arti continuamente, incapace di movimenti volontarii e di camminare, anche se stimolato energicamente. In tale stato dura per due giorni, poi si va lentamente rimettendo. - Viene ucciso.

Autopsia: Degenerazione grassa del fegato. Catarro intestinale. In un punto del tenue una placca emorragica. Gli altri organi non presentano fatti degni di nota.

Esame colturale. Fegato, milza, rene: negativo.

Contenuto gastrico ed intestinale: positivo (il germe si è sviluppato in grande quantità).

Cane 2.° — Si introduce nello stomaco l'emulsione di 20 gr. di patina da cui si sono eliminati i frammenti grossi cosicchè l' emulsione consta pressochè esclusivamente di spore. Fenomeni uguali al cane precedente, durati due giorni circa: dopo l' animale si rimette. In nessun momento si sono osservati fatti di eccitamento generale.

Cane 3° — Si introduce nello stomaco l'emulsione di 60 gr. di patina. Dopo un quarto d' ora insorge malessere generale, quindi fatti spasmodici con tremori non molto intensi. L' andatura è nettamente stassico spastica: l' animale è malsicuro nel porre gli arti sul suolo e cammina traballando. Dopo mezz'ora il cammino è impossibile e l' animale si rovescia sopra un fianco in preda a fatti spasmodici generali ed a tremori. Mancano i sussulti bruschi e gli accessi convulsivi. Numerose scariche prima poltacee e poi diarroiche: forte scialorrea. L' animale dura in tale stato per circa due ore, poi si ha un rilasciamento generale e dopo alcune ore la morte in coma.

Autopsia: La pia cerebrale è fortemente iperemica, mentre non lo è la midollare. Il fegato ed i reni presentano notevole degenerazione grassa: lo stomaco e l' intestino sono lievemente congesti e presentano un forte stato catarrale della mucosa.

Esame colturale: Negativo per tutti gli organi. Il contenuto gastrico ed intestinale danno abbondante sviluppo al germe.

Cane 4.° — Abbiamo in questo cercato di produrre un avvelenamento cronico somministrando nuovamente delle emulsioni di patine penicillari appena erano cessati i tremori determinati dalla somministrazione precedente. Ogni volta si introduceva nello stomaco, mediante sonda, l' emulsione di 20 a 30 gr. di patina, sempre eliminando il più possibile di micelo. In media la somministrazione si faceva di 5 in 5 giorni.

Tutte le volte si ebbe l'insorgenza del quadro completo coi fatti neuromuscolari caratteristici: tremori, stato spasmodico della muscolatura, andatura atassico-spastica tipica. I fenomeni durarono molto a lungo 3 giorni circa, nelle prime tre volte in cui si fece la somministrazione dell' emulsione penicillare: ma poi il cane presentò la risorsa del vomito abbondantissimo insorgente dopo 10 minuti circa: per una volta fu possibile evitarlo col somministrargli del cibo, ed il quadro durò ancora notevolmente a lungo, ma poi anche il cibo venne dal cane ostinatamente rifiutato. Per questo i fenomeni avevano una durata minore, da 16 a 24 ore. In tutti i casi si ebbe anche diarrea forte. Non possiamo dire di più, perchè i risultati non sono definitivi: ad ogni modo è certo che, almeno finora, i fenomeni presentati dall' animale si dileguarono sempre in modo completo senza lasciare postumi di natura neuromuscolare. Nemmeno si ebbe un grave deperimento organico. È notevole la intensissima scialorrea che le prime volte si presentava solo dopo la somministrazione

delle patine, mentre in seguito incominciava appena il cane veniva portato dallo *stabularium* nella camera di operazione. La quantità di saliva colante dalla bocca era enorme, un filo continuo per parecchie ore: non meno di 800 a 1000 cmc.

I risultati ottenuti con questa varietà di Penicillo glauco sono certo molto interessanti. Desta anzitutto sorpresa il fatto che i conigli, i quali morivano pure molto rapidamente (4 a 19 giorni), non presentassero in modo assoluto fatti neuromuscolari. Non si può pensare in alcun modo ad una refrattarietà della cellula nervosa, poichè l' iniezione dei tossici, come vedremo in seguito, produce fatti evidenti.

I risultati delle esperienze fatte colla nutrizione nei cani corrispondono, quindi, perfettamente a quanto si è osservato introducendo direttamente le spore penicillari nell' organismo, essendosi ottenuti gli stessi fenomeni di intossicamento coi caratteri di aumentata eccitabilità neuromuscolare, esagerazione dei riflessi, tremori e stato spasmodico della musculatura specialmente degli arti, che dopo un po' di tempo dà invece luogo a rilasciamento della muscolatura, pur persistendo i tremori per un periodo anche di due, tre giorni. Il tremore intenso rende il quadro a primo aspetto simile a quello che si ha coi tossici dell' *Aspergillus fumigatus*. Notiamo già fin d'ora, e lo vedremo meglio più avanti, che esistono in realtà delle differenze essenziali, poichè è caratteristica e costante nell' intossicazione aspergillare la presenza dei bruschi sussulti e della rigidità tetanica muscolare.

Anche con questa varietà le lesioni anatomiche, riscontratesi negli animali sottoposti alla nutrizione, sono limitate, mancando di solito quello stato di grave congestione e le lesioni a focolai emorragici che si osservano invece per la nutrizione con *Aspergillus fumigatus*. Nel tubo gastro-enterico le lesioni sono di solito scarse, trattandosi per lo più di un lieve stato di congestione, come è risultato anche dalle ricerche microscopiche eseguite in qualche caso. Solo due volte si sono osservati gravi fenomeni a carico del tubo intestinale, caratterizzati da forte congestione, ma questi sono eccezionali.

Infine richiamiamo qui, come abbiamo fatto per l' altra varietà di Penicillo, l' attenzione sul fatto del non ingresso in circolo delle spore penicillari. Gli esami colturali praticati cogli organi di animali morti per la nutrizione con polenta e con mais

penicillare, ci hanno dato risultati costantemente negativi. Non è possibile dare importanza ai pochissimi casi in cui si è avuto sviluppo del germe nelle provette seminate, sia perchè gli inquinamenti incidentali in queste esperienze sono molto facili, sia perchè si è trattato sempre di organi differenti.

In questo si ha una differenza pressochè assoluta in confronto dell' *Aspergillus fumigatus*, in cui l' ingresso in circolo delle spore è quasi costante. Un altro fatto interessante è che l' eliminazione del tossico dall' organismo degli animali intossicati avviene molto rapidamente: che non si ha cioè un accumulo dello stesso nell' organismo. Questo risulta dal complesso delle esperienze sulla nutrizione ed in modo speciale dai risultati ottenuti nel 4° cane.

3. Estratti tossici e loro natura.

Anche qui, per comodità di esposizione, dividiamo le esperienze in due gruppi: nel primo consideriamo gli effetti in genere dei tossici nei diversi animali: nel secondo esponiamo i risultati delle ricerche attorno ai caratteri generali ed alla natura dei tossici stessi. In quasi tutte le esperienze si è praticata la reazione al percloruro di ferro.

Parte I.ª — I tossici usati in queste ricerche sono stati ottenuti mediante la bollitura in alcool a 90° la bollitura durava dai 30 ai 40 minuti, l' alcool veniva filtrato ed evaporato: il residuo ripreso con acqua distillata (metà in cmc. del peso in gr. della patina). Col mais penicillare si è praticata una sola esperienza.

Esperienza (*Aprile*). — 600 grammi di mais penicillare infetto da un mese, coperto da un lieve strato di vegetazione ifomicetica che non ha alterato la costituzione della cariosside, viene bollito in alcool: il residuo (che dà lieve reazione verde al percloruro di ferro) viene ripreso con 60 cmc. di acqua distillata. Risulta un liquido di colore caffè chiaro con dei blocchi di sostanza bruna di consistenza cerea.

Cavia 1.ª — Iniezione di 30 cmc. Non presenta fatti degni di nota eccettuato un lieve grado di debolezza per un paio d' ore. - Dopo due giorni: iniezione di 20 cmc. Dopo un po' presenta un lieve grado di tremore nel cammino che dura tre ore circa. Vive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Non presenta fatti degni di nota.

Il risultato di questa esperienza prova che in realtà questo germe ha trovato sul mais condizioni tali di sviluppo, per cui è oltremodo scarsa la produzione di sostanza tossica; il che spiega bene i risultati negativi avuti coll' iniezione endoperitoneale e colla nutrizione. Su questo fatto abbiamo, come si è detto, in corso delle ricerche speciali. Anche notiamo la reazione al percloruro di ferro, che era in questo caso evidente, accompagnata ad un così scarso potere tossico. Su ciò ritorneremo in seguito.

Le altre esperienze furono fatte con patine bene sporificate di età da 6 a 15 giorni e furono praticate finora solo nei mesi caldi, dal Marzo al Settembre: anche qui il germe venne volta per volta isolato dall' ambiente.

Esperienza 1.ª (*Marzo*) — Quattro patine dell'età di 8 giorni, bene sporificate, di colore verde grigio, con sottile strato di micelo, vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 90 cmc. di acqua.

Cane 1.° pesante 7 Kg. — Iniezione di 20 cmc. Dopo 5 minuti insorge vomito, quindi fatti di eccitamento generale: il cane fa dei grandi salti nel laboratorio cercando di fuggire. Poi dopo 10 minuti circa cominciano tremori generali con fatti spasmodici in tutta la muscolatura: l' animale presenta gli arti leggermente divaricati, un po' rigidi, cammina con difficoltà e movendoli con incertezza il collo è rigido ed il capo piegato lievemente in basso. Questi fatti hanno dei periodi di remissione in cui l' animale è tranquillo. Dopo un' ora circa il cane è incapace di reggersi: si rovescia sopra un fianco: persistono i tremori: talvolta fa degli sforzi per sollevarsi ed allora si agita inutilmente sul suolo battendovi fortemente e ripetutamente il capo. Dalla bocca cola una grande quantità di saliva. Vi è un forte aumento di riflessi. Numerose scariche prima poltacee e poi liquide: poliuria intensissima. I fatti spasmodici cessano dopo 20 ore: poi si ha rilasciamento generale e alla 22.ª ora la morte.

A differenza dei tossici aspergillari, anche in questo sono mancati gli accessi tetaniformi con spasmo glottideo e rigidità generale del corpo: così pure mancarono i bruschi sussulti caratteristici.

Autopsia: La pia cerebrale è iperemica: non lo è invece il midollo. Il cavo addominale è congesto e contiene scarso essudato sieroso: il fegato presenta lieve degenerazione grassa: i reni ed i polmoni sono iperemici.

Cane 2.° di Kg. 6. — Iniezione di 30 cmc. Quadro analogo al precedente, caratterizzato specialmente da tremori intensi e da stato di

ipereccitabilità: il decorso è stato più rapido. Anche qui mancarono gli accessi tetaniformi, la rigidità muscolare ed i sussulti. Morte in 16 ore preceduta da un periodo di rilasciamento generale.

Autopsia: Congestione intensa del cavo peritoneale e delle anse intestinali con essudato siero-sanguinolento. Iperemia degli organi interni.

Coniglio 1.° di Kg. 2. — Iniezione di 10 cmc. Poliuria intensissima durante la prima mezz' ora: i fatti neuromuscolari incominciano dopo con convellimenti diffusi: tremori intensi: parèsi spastica prima del treno posteriore, poi anche dell' anteriore. Il quadro aumenta di intensità, dopo un' ora l' animale è rovesciato su un fianco incapace di eseguire movimenti volontari: rimane lì in preda a movimenti continui con degli aumenti accesionali di intensità. I riflessi sono esagerati. Dopo 10 ore i fatti cominciano a diminuire: si ha invece un rilasciamento generale che progredisce fino alla morte, che avviene 21 ore dopo l' iniezione. Numerose scariche diarroiche.

Autopsia: Iperemia intensa delle anse intestinali: lieve dei polmoni e degli altri organi.

Coniglio 2.° di Kg. 2,500. — Iniezione di 18 cmc. Quadro uguale al precedente, ma insorto più rapidamente. I fatti neuromuscolari diminuiscono già alla 7.ª ora: si ha rilasciamento generale e la morte dopo 10 ore.

Autopsia: Congestione intestinale e peritoneale meno intensa che nel caso precedente. Gli organi interni sono lievemente iperemici.

Esper. 2.ª (*Aprile*) — Quattro patine di otto giorni sono bollite in alcool che si filtra e si evapora: il residuo viene ripreso con 80 cmc. di acqua.

Cane di 6 Kg. — Iniezione di 40 cmc. Dopo 10 minuti insorgono i tremori muscolari ed i fatti spasmodici. Dopo $^1/_4$ d' ora è completo il quadro descritto sopra: la morte avviene dopo 33 ore ed è preceduta da 3 ore di rilasciamento generale. Diarrea e poliuria molto intense.

Autopsia: Lieve congestione del peritoneo e dei reni: iperemia della pia cerebrale: gli altri organi, compreso il midollo, non presentano fatti notevoli.

Esper. 3.ª (*Maggio*) — Quattro patine di 8 giorni vengono bollite in alcool che si filtra e si evapora: il residuo è ripreso con 80 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. — Iniezione di 40 cmc. Quadro come il precedente, morte dopo 24 ore.

Autopsia: Congestione della pia cerebrale: lieve essudato nel peritoneo: nulla di notevole agli altri organi: midollo spinale pallido.

ESPER. 4ª. (*Giugno*) — Due patine, una di 4, l' altra di 12 giorni, vengono bollite in alcool che si filtra ed evapora: il residuo è ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di 7 Kg. — Iniezione di 40 cmc. Quadro acutissimo ed oltremodo violento: morte in tre ore.

Autopsia: Nel cavo peritoneale nulla di notevole, non congestione nè essudato. Invece sono dilatati i vasi della pia midollare e congesti i polmoni. Gli altri organi non presentano fatti notevoli.

ESPER. 5.ª (*Luglio*) — Due patine di 15 giorni molto ricche di spore vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 60 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 4. — Iniezione di 20 cmc. Dopo mezz' ora è completo il quadro: morte in 5 ore.

Autopsia: Lievissima iperemia peritoneale senza essudato: congestione della pia cerebrale: nulla agli altri organi.

Cavia. — Iniezione di 10 cmc. Dopo alcuni minuti insorgono tremori accessuali che la obbligano a fermarsi se cammina e che ne scuotono il corpo specialmente in senso antero-posteriore: questi tremori si vanno facendo sempre più accentuati: insorge uno stato spasmodico, specialmente forte al treno posteriore, che rende oltremodo ondeggiante il cammino. I fatti si vanno facendo sempre più gravi: dopo 5 ore il cammino è impossibile: dopo 6 si ha la morte.

Autopsia: Lieve essudato peritoneale: anse non congeste: nulla agli altri organi.

ESPER. 6.ª (*Agosto*) — Due patine di 10 giorni vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Tremori intensi dopo 20 minuti: poi stato spasmodico della muscolatura che dura parecchie ore. Sopravvive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Il quadro completo dopo 30 minuti: morte in 5 ore.

Autopsia: Lieve essudato del cavo peritoneale senza fatti congestizi notevoli: nulla agli altri organi.

Coniglio. — Iniezione di 15 cmc. Solo dopo un paio d' ore presenta dei tremori muscolari non molto forti, ma persistenti, senza fatti spasmodici. Muore dopo 20 ore.

Autopsia: Lieve congestione del fegato e dei reni con scarso essudato peritoneale.

Da questa varietà di Penicillo si può adunque, colla bollitura in alcool, estrarre una sostanza tossica che, iniettata agli animali, produce dei fenomeni caratteristici, uguali a quelli che si ottengono od inoculando direttamente il germe o mediante la nutrizione con polenta mista a patine penicillari. I fenomeni consistono in esaltata eccitabilità neuromuscolare, tremori generali, stato spasmodico degli arti, che ostacola i movimenti volontarii. A questi fatti si associano sempre diarrea e poliuria intensa.

Questo quadro di primo acchito sembra uguale a quello prodotto dai tossici aspergillari; tuttavia osservando bene, non pochi sono i caratteri differenziali. Mancano anzitutto i bruschi sussulti muscolari e le scosse, che si hanno costantemente dopo l'iniezione dei tossici aspergillari: non si ha mai la rigidità tetanica generale, che fa dell'animale un tutto unico, duro come un pezzo di legno: manca lo spasmo glottideo. Non si ha qui il succedersi di accessi tetaniformi e convulsivi, alternati da fasi di rilasciamento generale: per i tossici penicillari l' animale agita invece continuamente e spasmodicamente gli arti. A tratti si hanno anche qui tentativi di rialzarsi, l'animale batte allora fortemente il capo sul terreno. La dispnea non è mai molto intensa: i battiti cardiaci non così frequenti come nella intossicazione aspergillare. Inoltre mentre in questa la morte si ha per lo più per soffocazione da spasmo glottideo, qui si ha con fatti di rilasciamento generale e di coma. A questo tossico sono specialmente sensibili i cani, che presentano un quadro caratteristico ed acuto: meno sensibili sono le cavie e meno ancora i conigli.

Il potere tossico delle patine pare, dalle esperienze nostre, accentuarsi coll' aumento della temperatura ambiente: i fatti più acuti e la morte più rapida si sono infatti avuti nei mesi più caldi (Luglio e Agosto) con quantità minori di estratto

Le lesioni anatomo-patologiche si caratterizzano per la loro poca intensità: è infatti mancata la forte congestione peritoneale con essudato siero-sanguinolento, che si osservò costantemente coi tossici dell' altra varietà di Penicillo, ed è poi notevole che la reazione peritoneale è stata tanto meno intensa quanto più acuti furono i fatti di intossicamento e più rapida la morte.

Anche gli altri organi hanno mostrato di risentire poco dell' entrata in circolo del tossico: al cervello si ebbe sempre solo una mediocre congestione della pia: al midollo spinale solo qualche

volta si ebbe iperemia. Le alterazioni midollari verranno studiate a parte: tuttavia ci è già possibile affermare che i fatti di degenerazione primaria, costanti nell' intossicazione aspergillare, mancano il più delle volte negli animali morti per i tossici penicillari, quantunque i fenomeni neuromuscolari siano oltremodo intensi: anche quando le lesioni esistono, i caratteri istopatologici non sono mai così gravi come quelli che si osservano nei midolli dei pellagrosi e negli animali sottoposti ad intossicamento aspergillare.

Abbiamo anche provato l' introduzione dei tossici per la via gastro-enterica, per vedere se la mucosa gastrica ed intestinale offrissero, come per l' altra varietà di germe, una barriera al loro passaggio in circolo. Le esperienze praticate furono due:

Esper. 1.ª — Ad un cane si introducono nello stomaco 40 cmc. di estratto penicillare (il residuo dell' Esp, 2.ª di Aprile) corrispondente a due patine. Dopo 20 minuti incominciano i tremori muscolari: dopo 35 minuti il quadro è completo e dura invariato per circa un giorno. L' animale muore dopo un breve periodo di rilasciamento generale.

Autopsia: Non si osservano fatti notevoli nè allo stomaco, nè all'intestino, nè agli organi interni. Congestione della pia cerebrale: il midollo appare pallido.

Esper. 2.ª — Ad 1 cane di 10 Kg. si introducono nello stomaco 40 cmc. di estratto (il residuo dell'esperienza 3.ª di Maggio) corrispondente a due patine. Dopo $^{1}/_{4}$ d' ora cominciano i tremori e lo stato spasmodico della muscolatura: dopo mezz' ora il cane è rovesciato sopra un fianco, incapace di qualunque movimento volontario. Ha numerose scariche diarroiche e poliuria intensa. I fenomeni durano invariati per due giorni. Al terzo giorno l' animale tenta talvolta qualche movimento volontario, interrotto subito dall' aumento del tremore e dello stato spasmodico. Se lo si solleva, non può sostenersi e cade. Rifiuta cibo e bevanda. Al quarto giorno l' animale sollevato riesce a fare qualche passo barcollando, poi cade di nuovo: sono sempre forti i tremori: rifiuta cibo e bevanda. Al quinto la deambulazione è possibile, l' animale però barcolla come un ubbriaco e cade al minimo intoppo. I tremori sono diminuiti: esiste ancora un po' di spasmo. Rifiuta il cibo, invece beve avidamente e ripetutamente. La diarrea è cessata. Al sesto esiste solo uno stato di debolezza generale grave: l' animale mangia avidamente e dopo altri due giorni è rimesso completamente.

A parte la durata eccezionale dei fenomeni morbosi, le esperienze citate dimostrano che il tossico non soffre impedimento al

passaggio in circolo anche per la via gastro-enterica, il che del resto era prevedibile dopo i risultati ottenuti colla nutrizione e coll' introduzione delle patine nello stomaco.

Il decorso e la sintomatologia furono identici a quelli osservati dopo le iniezioni endoperitoneali dei tossici: le lesioni anatomo-patologiche, nel caso seguìto da morte, pure perfettamente eguali.

Parte 2.ª — Anche per questa varietà ci limitiamo ad esporre alcune ricerche preliminari sul luogo di formazione del tossico e sopra i caratteri e la natura sua. Abbiamo praticato la ricerca del luogo di formazione del tossico facendo l' estrazione da patine in varie epoche di sviluppo. Prima che sia iniziata la sporificazione il tossico è scarso: ad un cane si è inoculato l' estratto di 3 patine completamente bianche dell' età di 20-24 ore, senza spore, avendosi solo dei disturbi lievi, consistenti in tremori accessuali poco intensi ed in uno stato spasmodico della muscolatura poco accentuato: quando invece cominciano ad apparire le spore il potere tossico è già molto netto. Valgano a prova le seguenti esperienze, le quali furono fatte nel mese di Agosto, quando, cioè, la temperatura ambiente rappresentava l' *optimum* per lo sviluppo del germe.

Esper. 1.ª — Due patine di 30 ore, l' una completamente bianca, l' altra macchiata qua e là da piccole macchie verdastre, sono bollite in alcool: il residuo vien ripreso con 40 cmc. d' acqua.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo 20 minuti si notano lievi tremori accessuali che persistono per quasi due giorni. La cavia ne resta un po'ostacolata nel cammino: non si notano però fatti spasmodici. Vive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo un quarto d' ora tremori piuttosto forti, accessuali, che durano per un paio di giorni. Non fatti spasmodici. Vive.

Esper. 2.ª — Una patina di 48 ore di un colore verde pallidissimo a chiazze è bollita in alcool: il residuo è ripreso con 20 cmc.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo un quarto d'ora tremori forti con lieve stato spasmodico: i fatti durano per tre giorni. Vive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo un quarto d' ora tremori intensi, poi fatti spasmodici specialmente al treno posteriore. In tale stato dura 24 ore, poi i fatti spasmodici diminuiscono, mentre i tremori persistono ancora al terzo giorno. Vive.

Risulta quindi che la comparsa del tossico avviene quando si inizia la formazione delle spore: tuttavia la quantità di queste era in ambedue le esperienze troppo scarsa per attribuire ad esse l'esclusiva comparsa della manifestazione patogena. Noi abbiamo, per risolvere la questione, ripetuto le esperienze praticate per l' altra varietà di penicillo, abbiamo, cioè, separato nel modo più completo possibile spore e micelo di patine bene sviluppate e praticata l' estrazione separata. Le esperienze eseguite sono tre. In tutte abbiamo praticata la separazione sbattendo le patine in acqua. Delle spore, per essere sicuri di non avere ad esse commisto del micelo, si prendevano solo quelle che si staccavano ai primi tre lavaggi, raccogliendole sopra un filtro di carta: il resto veniva lavato accuratamente in acqua, che si rinnovava almeno una diecina di volte: si aveva allora il micelo di colore bianco, che dall' esame dimostrava d' essere stato privato quasi completamente delle spore. Una separazione assoluta però è stata impossibile.

Esperienza 1.ª — Si pratica la separazione delle spore e del micelo di due patine di 6 giorni estraendo separatamente i tossici.

Micelo. L'alcool filtrato caldo è limpido, di colore verdastro e raffreddandosi lascia depositare dei fiocchi minutissimi, biancastri. Il residuo si riprende con 30 cmc.

Cane di Kg. 7,500. — Iniezione di 30 cmc. Ha vomito intenso e qualche scarica diarroica: presenta segni di depressione, ma nessun fatto muscolare. Vive.

Spore. L' alcool filtrato caldo è limpido, di colore caffè chiaro: il residuo è ripreso con 30 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 15. — Iniezione di 30 cmc. Dopo 10 minuti vomita, poi bruscamente insorge il quadro classico: tremori, stato spasmodico della muscolatura: dopo soli 20 minuti il cane è rovesciato sopra un fianco incapace di muoversi. Dura in tale stato per 12 ore, poi subentra rilasciamento generale e dopo 2 ore la morte.

Autopsia: Lieve congestione del cavo peritoneale e delle anse intestinali con essudato sieroso: iperemia della pia meninge cerebrale.

Esper. 2.ª — Si pratica la separazione del micelo e delle spore di 4 patine di 10 giorni.

Micelo. Il residuo è ripreso con 60 cmc.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo mezz' ora insorgono tremori che durano per due giorni senza fatti spasmodici. Vive.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo venti minuti tremori, dopo un' ora lievi fatti spasmodici. Dopo 3 giorni sta bene.

Spore: il residuo è ripreso con 60 cmc.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo 15 minuti tremori intensi poi fatti spasmodici con andatura barcollante. Il giorno dopo ha il pelo arruffato, persistono i fatti neuromuscolari: muore dopo 3 giorni.

Autopsia: Lieve congestione del cavo con scarso essudato.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo 10 minuti tremori: poi fatti spasmodici intensi e continui. Muore dopo 2 giorni.

Autopsia: Reperto identico al precedente.

Esper. 3.ª — Separazione accurata delle spore e del micelo di due patine di 12 giorni.

Micelo: il residuo è ripreso con 30 cmc.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo 15 minuti presenta tremori che durano due giorni, poi si rimette.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo 15 minuti presenta tremori con lieve stato spasmodico: dopo 3 giorni sta bene.

Cane di 7 Kg. — Iniezione di 15 cmc. Presenta dopo mezz' ora il quadro classico che dura 48 ore e termina colla morte.

Autopsia: Lieve congestione del cavo peritoneale con scarso essudato: degenerazione grassa del fegato: nulla agli altri organi.

Spore. Il residuo è ripreso con 30 cmc.

Cavia 1.ª — Iniezione di 5 cmc. Dopo un quarto d' ora tremori e fatti spasmodici: muore dopo 2 giorni e mezzo.

Cavia 2.ª — Iniezione di 10 cmc. Dopo un quarto d' ora tremori e fatti spasmodici intensi: muore dopo 24 ore.

In ambedue all' autopsia si è osservata congestione del cavo e delle anse con essudato scarso.

Cane di Kg. 6. — Iniezione di 15 cmc. Quadro molto intenso con morte dopo 15 ore.

Autopsia: Lieve essudato nel cavo peritoneale che è pochissimo congesto: pia cerebrale iperemica.

Risulta adunque da queste esperienze che, analogamente a quanto si è osservato per la varietà *A*, non si può attribuire alla sola spora il potere tossico che esiste anche nel micelo.

Bisogna invece ammettere che il tossico si forma nel micelo e che da esso passa poi nella spora, alla quale spetta ad ogni modo la massima parte del potere tossico: i risultati ottenuti cogli estratti delle spore sono stati infatti oltremodo più intensi che cogli estratti del micelo.

I risultati nostri differiscono in ciò notevolmente da quelli del Di Pietro, che alla spora sola attribuisce importanza nella manifestazione dei fatti morbosi caratteristici. Tale fatto, che crediamo al tutto nuovo, è importante in quanto dimostra che il materiale alimentare infetto può essere patogeno, qualunque sia la fase di sviluppo del germe. Quanto ai caratteri del tossico ed alla sua natura lo studio nostro è ancora ad uno stadio iniziale. Tuttavia abbiamo raccolto alcuni dati interessanti.

Le precedenti esperienze furono praticate colla bollitura in alcool. Questo, filtrato a caldo si presenta di colore bruno verdastro, limpidissimo, col raffreddamento lascia precipitare dei fiocchi biancastri minutissimi, che non contengono sostanza tossica. Il residuo dell'evaporazione è di colore bruno, di sapore amarognolo, di odore aromatico. È poco solubile in acqua fredda; un po' più nella calda. Solubilissimo in alcool e in etere. Con questo è possibile estrarre in modo completo il tossico, liberandolo dalle impurità solide eterogenee. L' estrazione avviene in modo completo anche dai soluti acquosi e dai soluti alcalini. Riprendendo infatti il residuo con soluzione di Na $CO_3$ 1 $^0/_0$ e sbattendo con etere, decantando ed evaporando, si ha la sostanza attiva, mentre la parte rimasta è innocua agli animali a cui si inietta.

La sostanza attiva si ottiene parzialmente anche colla bollitura in acqua: in maggior quantità si ottiene bollendo le patine in soluzione di Na $CO_3$ 1 $^0/_0$. Invece gli estratti colla bollitura in acqua acidulata con HCl sono completamente inattivi.

L' estrazione avviene anche, ma assai lentamente, colla digestione in alcool comune a 38° gradi: dopo 10 giorni di contatto gli estratti alcoolici non ci hanno dimostrato potere tossico, che si è invece avuto nettissimo dopo 25 giorni.

Questi risulti differiscono notevolmente da quelli coll' altra varietà di *Penicillum glaucum*, in cui solo la bollitura in alcool ha permesso l' estrazione della sostanza tossica specifica.

Il tossico resiste a temperature molto elevate: i nostri soluti furono tutti sterilizzati mediante la bollitura, che talvolta si

prolungò per prova fino a 30-40 minuti, senza che ne risentissero danno: non solo, ma il potere tossico non muta se la bollitura si pratica con soluzione fortemente alcalina (Na $CO_3$ 1 $^0/_0$), o fortemente acida (HCl 1 $^0/_0$). Notiamo qui che la reazione dei soluti acquosi è o neutra o debolmente acida, ma che l' attività specifica non muta rendendoli nettamente alcalini od acidi. Si ha sempre il quadro classico perfettamente uguale per intensità e decorso. Le esperienze praticate per stabilire i fatti accennati sono parecchie e noi le omettiamo solo per non ripetere la descrizione di quadri costantemente identici.

Un punto che merita speciale considerazione è quello che riguarda i rapporti eventuali del tossico da noi studiato coi composti fenolici, che, come prodotti del ricambio materiale del germe, si trovano nei substrati colturali, ed a cui Gosio ha dato importanza per la genesi della pellagra. In una recentissima pubblicazione [19], egli è anzi ritornato sull' argomento riaffermando i concetti altra volta sostenuti e cercando di identificare i reperti nostri per gli Aspergilli e quelli del Di Pietro per i Penicilli con i suoi. Secondo lui sia gli Aspergilli, che la specie penicillare studiata dal Di Pietro sarebbero forti produttori di corpi fenolici, i quali sarebbero in massima quantità all' epoca del maggior sviluppo del germe e che quindi allora eserciterebbero più forte il loro potere patogeno.

Per quanto riguarda gli Aspergilli, noi tratteremo questo argomento in una prossima pubblicazione. Per quanto riguarda i Penicilli abbiamo visto che la varietà precedentemente studiata non produceva affatto corpi fenolici: i fenomeni tossici caratteristici non potevano essere ascritti che al germe stesso, sia al micelo che alla spora.

Per la varietà di cui trattiamo ora, le cose cambiano di aspetto, in quantochè può essere realmente produttrice di fenoli; negli estratti pel mais avariato la reazione al percloruro di ferro è un fatto costante: nella coltura in liquido di Raulin la reazione è frequente. Noi abbiamo cercato di vedere se esistesse un rapporto tra l' intensità della reazione fenolica ed il grado di tossicità dell' estratto. Intanto avevamo già parecchi dati contrarii all' asserzione di Gosio. Il mais infetto, in cui la reazione fenolica è un fatto costante, è assai meno attivo delle patine pure in cui la reazione invece molto spesso manca,

Il tossico penicillare viene estratto dall' alcool alla temperatura di 38° solo assai lentamente: abbiamo visto attivi solo gli estratti delle patine che erano rimaste in alcool per oltre 20 giorni, mentre la reazione fenolica, quando esiste, si nota dopo poche ore di contatto. L' etere estrae i composti fenolici dai soluti solo in presenza di acido libero: invece il tossico specifico si estrae completamente in mezzo alcalino, in soluzione di $Na\,CO_3$ 1 %.

I composti fenolici si sciolgono nelle soluzioni diluite alcaline, perdendo gran parte della loro attività: i tossici penicillari invece mantengono invariata la loro attività, qualunque sia la reazione del mezzo liquido in cui sono sciolti. Valga a prova la seguente esperienza:

Tre patine di 15 giorni vengono bollite in alcool: il residuo è ripreso con 60 cmc. di acqua. Il soluto ha reazione neutra: Il residuo non ha dato reazione fenolica al percloruro di ferro.

1.° Cane di Kg. 7. — Si iniettano 20 cmc. Dopo un quarto d' ora insorgono i fatti neuro-muscolari più volte descritti: il quadro è completo dopo mezz' ora: la morte si ha dopo 5 ore.

2.° Cane di Kg. 10. — Si iniettano 20 cmc. di tintura portata con alcune goccie di $NH_3$ a netta reazione alcalina. Dopo 10 minuti si ha il quadro completo con fatti spasmodici intensi: dopo 3 ore avviene la morte.

3.° Cane di Kg. 12. — Si iniettano 20 cmc. di tintura portata con alcune goccie di HCl a netta reazione acida. Dopo 30 minuti il quadro è completo: la morte avviene dopo 5 ore.

Questa esperienza ci pare decisiva: del resto abbiamo già visto sopra che l'estrazione avviene anche mediante bollitura in soluzione acquosa di $Na\,CO_2$.

Ad ogni modo noi abbiamo anche studiato, come Gosio, l' epoca di comparsa della reazione fenolica, sia nei mezzi colturali che nelle patine stesse (nel mais abbiamo già detto che la reazione è costante ed il mais è quasi assolutamente privo di sostanza tossica). Non possiamo affatto confermare quanto il Gosio ha affermato, che cioè esista un aumento progressivo dei composti fenolici nel mezzo colturale. Estraendo con etere, previa acidificazione, grandi quantità di liquido colturale (di 3-4 scatole

Tyndal) dopo 12-15 giorni di sviluppo ci è accaduto di avere patine dotate di un forte potere tossico, senza che il residuo etereo desse alcuna reazione: mentre il liquido di patine più giovani, anche meno attive, diede talvolta netta la reazione al percloruro.

Del resto le esperienze fatte praticando l' estrazione separata del micelo e delle spore ci hanno dato una risposta decisiva. L' estratto etereo del liquido colturale ci ha dato una lieve reazione violacea in tutte tre le esperienze. L' estratto delle spore e del micelo privati in modo assoluto del liquido di coltura, non ci ha dato reazione fenolica: l'uno e l' altro estratto, in tutte tre le esperienze, ha negli animali prodotto i fenomeni più tipici dell' intossicamento penicillare.

Ai corpi fenolici, pur non negando che possono avere un' azione nociva speciale, non può essere attribuita importanza nella genesi dei fenomeni neuromuscolari descritti, che sono invece determinati da tossici specifici contenuti nel micelo e nelle spore del germe.

### Riassunto delle esperienze colla varietà *B*.

I risultati delle esperienze da noi descritte nei precedenti capitoli concordano nella dimostrazione che questa 2ª varietà di Penicillo è dotata di un potere tossico specifico, il quale si manifesta con caratteri costanti ed identici, sia che il germe venga introdotto nell' organismo direttamente per via venosa o peritoneale, sia che vi giunga per la via gastro-enterica, sia infine che si inoculino i tossici estratti artificialmente dal germe stesso.

I caratteri con cui si manifesta il potere tossico consistono specialmente in fatti neuromuscolari con tremori, esagerazione dei riflessi, fatti spasmodici diffusi a tutta la muscolatura. A questi fatti generali si aggiungono fatti locali, che naturalmente variano secondo la via di introduzione.

Il germe introdotto per via peritoneale determina fatti di irritazione che però sono di gran lunga inferiori a quelli prodotti dall' altra varietà: si ha di solito una modica congestione con scarso essudato siero-gelatinoso. Nei casi in cui si introducono le emulsioni, avviene una rapida fagocitosi con eliminazione sia del micelo che delle spore: quando si introducono dei grossi frammenti o le cariossidi, si ha incapsulamento per una sottile

pseudo-membrana connettivale. In ogni caso manca la intensa reazione leucocitaria determinata dagli aspergilli.

La nutrizione con materiale penicillare determina solo lieve congestione locale (in due cavie soltanto, morte acutamente, si ebbero fatti gravi): mai si ebbe l'ingresso delle spore in circolo: fatto che concorda con quanto si ha per l' altra varietà di Penicillo.

Anche le reazioni locali determinate dai tossici sono assai lievi: si ha mediocre congestione con essudato sieroso, talvolta lievemente sanguigno. Nonostante l' intensità dei fatti neuro-muscolari, le alterazioni a carico del midollo non sono costanti: invece si ha sempre un grado notevole di congestione della pia cerebrale.

In complesso i risultati concordano con quelli descritti dal Di Pietro per la sua varietà di Penicillo: alcuni dati nostri tuttavia ne differiscono. Così noi abbiamo trovato pochissimo sensibili i conigli: coll' introduzione diretta del germe e colla nutrizione non siamo riusciti a produrre in essi dei fenomeni neuromuscolari: i tossici solo in grande quantità, molto superiori a quelle necessarie per i cani, hanno dato fenomeni a carattere piuttosto lieve. Il Di Pietro invece avrebbe avuto anche coll' introduzione di patine nello stomaco fenomeni caratteristici ed intensi.

Noi abbiamo trovato che anche il micelo contiene del tossico, benchè in minor quantità della spora. Questo fatto ha non solo una notevole importanza scientifica, ma anche una portata pratica, in quanto dimostra che il materiale inquinato è sempre tossico, qualunque sia il periodo di sviluppo del germe. Infine il fatto più importante, su cui richiamiamo in modo specialissimo l' attenzione, è la frequenza con cui questo germe si ritrova negli ambienti in dati periodi dell' anno: non solo esso non è così scarso come parrebbe risultare dalle ricerche del Di Pietro, ma durante i mesi caldi esso si trova in quantità oltremodo grandi prevalendo di gran lunga sulla forma precedente. Lo stesso germe fu isolato anche dal mais, che noi avevamo fatto avariare negli stessi ambienti.

I particolari riguardo al ciclo biologico di questa e di altre forme di ifomiceti saranno, come già si disse, pubblicati a parte: ci basti per ora affermare il fatto di cui facilmente si intuisce l' importanza per la genesi delle varie forme di pellagra, e più

che tutto per la profilassi della malattia stessa. Su questo ritorneremo più avanti, dopo esposta l' importanza di questo germe nella genesi di alcune forme di pellagra.

### Parallelo fra le due varietà di germi.

Per quanto dopo ogni gruppo di esperienze abbiamo riassunto i fatti principali che da esse emergono, crediamo opportuno riassumere ancora in poche linee le particolarità più importanti, facendo anche un parallelo tra i caratteri dei fenomeni morbosi che le due varietà di Penicillo producono, e a seconda delle quali a un di presso pare si comportino tutte le altre varietà.

Risulta anzitutto che le due varietà di germe producono fenomeni diversi ed opposti, poichè la varietà *A* determina dei fatti di depressione generale, mentre la varietà *B* determina dei fenomeni di eccitamento generale. Tuttavia è opportuno notare che tra le due varietà esiste qualche analogia nel fatto che colla 2ª specialmente se si iniettano i tossici estratti artificialmente dal germe, può, dopo il periodo di eccitamento generale, subentrare una fase di rilasciamento, che ricorda il quadro prodotto dalla 1ª varietà.

Nell' intossicamento determinato dalla varietà *A*, fin dal suo inizio, il quadro si manifesta con uno stato di depressione generale che ricorda l' intossicamento alcoolico acutissimo: infatti l' animale comincia a reagire meno agli stimoli esterni: si muove con difficoltà preferendo stare adagiato sul suolo: se viene obbligato a sollevarsi cammina a fatica per ricadere tosto inerte. Non presenta fenomeni netti di atassia: mancano tremori: il tono muscolare è molto diminuito. Naturalmente il quadro differisce a seconda del modo con cui si è trattato l' animale.

Nell' intossicamento acuto che si ha per l' iniezione dei tossici o (nelle cavie) delle patine, il quadro si svolge in 12-24 ore e l' animale muore in istato di torpore generale, senza presentare altri fenomeni caratteristici: invece quando l' avvelenamento è meno rapido, il che si verifica specialmente per la via della nutrizione, i fenomeni sono gli stessi di quelli acuti, ma meno intensi. Ricordiamo qui i due cani morti dopo 2 e 3 mesi di nutrizione e che negli ultimi tempi presentarono segni di debolezza, di abbattimento progressivo, non rispondente al grado di deperimento organico.

Il quadro offerto dalla varietà *B* è caratterizzato invece da aumento dell' eccitabilità neuromuscolare e dalla comparsa, fin dai primi momenti, di tremori intensi. I fenomeni di intossicamento acuto, che si sono osservati tanto nelle cavie quanto nei cani per iniezione dei tossici, consistono in eccitamento iniziale, a cui seguono tremori muscolari diffusi a tutto l' organismo, esagerazione spiccata dei riflessi, stato spasmodico della muscolatura. Il quadro ha delle analogie con quello che si ha in seguito ad avvelenamento per i tossici aspergillari: mancano però i bruschi sussulti e gli accessi tetaniformi, che questi producono invece costantemente. È notevole il fatto che lo stato spasmodico della muscolatura è il primo a scomparire se l' animale non soccombe, mentre i tremori durano di più e che la morte è costantemente preceduta da un periodo piuttosto lungo di rilasciamento generale.

Se i fenomeni sono meno acuti, e ciò si ha specialmente colla nutrizione, il quadro clinico insorge più tardi ed è caratterizzato da tremori e qualche volta da atassia: manca invece sempre lo stato spasmodico della muscolatura che si ha nell' intossicazione acuta. Sia l' una che l' altra varietà, introdotta nel tubo gastro-enterico mediante la nutrizione, determina scarsissimi disturbi: mancano infatti quasi costantemente le scariche diarroiche intense e spesso sanguinolente, che sono invece un fatto costante nella nutrizione aspergillare.

Risulta poi evidentissimo per ambedue le varietà di Penicillo che il germe agisce solo per il tossico che esso contiene sia nel micelo che nella spora: sia esso introdotto nell' organismo per via venosa o peritoneale, o vi penetri invece per il tubo gastro-enterico, l' azione dei succhi organici ne mette in libertà il tossico, che entra immediatamente in circolo ed esercita in modo assai rapido la sua azione. La riprova del fatto sta in questo che, tanto introducendo emulsioni di spore o frammenti di patine, quanto iniettando tossici, è sempre necessaria una quantità pressochè uguale di germe per produrre fenomeni di uguale intensità. In questo i Penicilli differiscono nettamente dagli Aspergilli, in cui bastano quantità minime di spore a produrre fenomeni oltremodo gravi.

Anche per ciò che riguarda le lesioni anatomo-patologiche, le due varietà di Penicillo presentano delle diversità e delle analogie degne di essere ancora ricordate. In seguito all' introduzione diretta del germe nell' organismo, e ciò è in modo speciale

evidente per l' iniezione intraperitoneale di emulsioni, la reazione locale è di solito assai più intensa per la varietà *A* che per la varietà *B*, e ciò corrisponde alla morte più rapida per quantità uguali di emulsioni: la prima produce infatti un' intensa congestione con abbondante essudato siero-sanguinolento e con iperemia degli organi interni: la seconda produce solo modica iperemia locale, essendo di solito normali gli altri organi. Se la quantità di germe inoculata non è mortale, uccidendo gli animali dopo alcuni giorni si vede che dal cavo peritoneale è scomparsa ogni traccia del germe, e ciò in rapporto colla rapida fagocitosi che abbiamo potuto constatare. Parecchie volte, esaminando l' essudato peritoneale di cavie a cui erano state iniettate delle emulsioni di spore, vi abbiamo notato infatti numerosi elementi leucocitarii contenenti delle spore facilmente riconoscibili per la forma e per la speciale rifrangenza. In ciò vi è una differenza assoluta con quanto si osserva per l' *Aspergillus fumigatus* introdotto in condizioni normali; mentre il quadro è più somigliante a quanto si ha per le spore aspergillari morte per l' azione del calore o di agenti chimici, quantunque anche per queste si abbia una reazione leucocitaria straordinariamente più intensa che per i Penicilli, e prevalga sempre, come noi abbiamo recentemente dimostrato, la distruzione extracellulare.

La diversa reazione locale risulta molto più accentuata iniettando nel peritoneo i tossici estratti dalle spore: infatti con quelli della 1ª varietà si osserva costantemente una intensissima congestione delle anse intestinali e del peritoneo con abbondante essudato siero-sanguinolento: con quelli della 2ª i fatti peritoneali sono di gran lunga meno intensi e solo quando la morte dell'animale è avvenuta in modo non acutissimo (20-30 ore), si ha modica iperemia del peritoneo e delle anse intestinali. Questa corrisponde a quanto si ha per le altre sierose, e ciò fa pensare che tali fenomeni siano secondari all' ingresso dei tossici in circolo, mentre per la prima varietà è necessario ammettere un vero e grave processo flogistico locale. Questa differenza nel modo di comportarsi si osserva per tutte le specie di animali.

Quanto alle alterazioni del sistema nervoso centrale è comune ai due tossici un' intensa congestione della pia cerebrale. Nel midollo la prima varietà non dà mai le degenerazioni primarie: la seconda le produce in circa la metà dei casi, ma esse sono allora scarse e poco accentuate in confronto a quelle che si osservano per i tossici aspergillari.

Colla nutrizione invece le differenze sono assai minori: sia coll' una che coll' altra varietà di germe si hanno delle lesioni intestinali non molto intense con congestione della mucosa e delle pareti. Negli altri organi manca di solito qualsiasi fatto di congestione. Tanto meno si osservano i fatti emorragici e flogistici, che si hanno invece quasi costantemente in seguito alla nutrizione con materiale aspergillare: e ciò è certamente in rapporto al fatto che manca sempre per i Penicilli il passaggio in circolo e la localizzazione, nei varî organi, delle spore, che è invece un fenomeno quasi costante per l' *Aspergillus fumigatus.*

Quanto all' influenza del mezzo nutritivo per la produzione dei tossici di questi germi, in termini generali pare che non abbia una grande importanza: solo notiamo che la varietà *B* coltivata nel mais ci è risultata sempre meno tossica che quando era cresciuta in liquido di Raulin.

Rimane il rapporto tra tossicità e prodotti fenolici. Per la 1ª varietà ricordiamo che non abbiamo mai avuto la reazione fenolica sia negli estratti forniti dai mezzi di coltura, sia in quelli fatti colle patine, pur essendo, come abbiam visto, costanti e spiccate le proprietà tossiche.

Per la 2ª varietà, avendosi pure qualche volta la reazione fenolica, non esiste alcun rapporto tra l' intensità sua ed il potere tossico: basti ricordare che cogli estratti del mais infetto la reazione è costante, mentre il potere tossico è oltremodo scarso.

## Sull' importanza dei Penicilli nell' etiologia della Pellagra.

Dopo i risultati da noi esposti nei capitoli precedenti sopra l' azione patogena di queste due varietà di Penicillo glauco, non è possibile negare a questa specie di ifomiceti un valore nella etiologia della pellagra.

Nostro còmpito è ora di analizzare i risultati ottenuti e di cercare di stabilirne l' importanza nell' etiologia e patogenesi della pellagra, raffrontandoli specialmente colle diverse forme e manifestazioni morbose che questa malattia può presentare nell' uomo. Verrà da ciò una nuova dimostrazione del concetto ammesso dalla massima parte degli autori, e che recentemente uno di noi, stabilendo l' importanza delle diverse specie aspergillari (*fumigatus, e flavescens*) nella genesi della pellagra,

specialmente delle forme acute, veniva ad affermare, che cioè l' etiologia non ne è unica, ma che diversi fattori contribuiscono a crearne il quadro ed a modificarne il decorso.

Nell' apprezzare l' importanza e nel determinare la parte che spetta a questi ifomiceti nell' etiologia della pellagra, noi dovremo tener conto non solo dei risultati ottenuti nelle diverse specie di animali, ma anche dell' evoluzione biologica del germe e della diffusione sua in natura, mettendoli in rapporto col ciclo annuale dell' endemia pellagrosa, essendo risultato evidente per gli aspergilli il valore di questi fattori.

Le forme di pellagra si possono clinicamente distinguere in due grandi categorie: croniche ed acute.

Le forme croniche sono caratterizzate specialmente da fatti di abbattimento generale con deperimento progressivo. Come fenomeni fisici si notano quasi costantemente eritemi, disturbi gastro-intestinali con diarrea più o meno intensa, parestesie, alterazioni della motilità, cammino talvolta atassico, riflessi tendinei il più spesso aumentati. Mancano d' ordinario l' aumento del tono muscolare, le contratture ed i sussulti. Psichicamente si ha il più di sovente un certo grado di confusione mentale, idee melanconiche, talvolta tendenza al suicidio; sebbene si possano avere anche altre forme svariate di malattie mentali.

Le forme acute (tifo pellagroso) che possono insorgere sia in individui apparentemente sani, sia sopra un fondo di pellagra cronica, sono caratterizzate da decorso rapido (per lo più di pochi giorni) con elevamento febbrile (39°-40°-41°) fino dai primi momenti, fatti di intenso eccitamento neuromuscolare, sussulti bruschi, sia spontanei che provocati, simili a quelli degli animali avvelenati colla stricnina, rigidità tetanica, contratture muscolari, esagerazione dei riflessi tendinei con frequente clono del piede. Psichicamente si ha forte confusione e disordine mentale con frequenti fasi di eccitamento.

Tra questi due grandi gruppi esistono poi delle forme intermedie, nelle quali si possono notare dei caratteri comuni all' una ed all' altra: forme che di solito si manifestano in individui affetti da pellagra cronica come riacutizzazioni del processo già in corso e nelle quali si osservano prevalentemente fatti di natura neuromuscolare, consistenti in esagerazione dei riflessi, paresi spastica, tremori, mancando però completamente i sussulti, la rigidità tetaniforme ed i notevoli rialzi di temperatura caratteristici della forma acuta. In questi casi i fenomeni psichici

variano, potendosi presentare sia fatti di eccitamento che fatti di depressione con tendenze lipemaniache. Costante è un certo grado di confusione mentale.

Naturalmente i fenomeni che si ottengono sperimentalmente negli animali adoperando germi puri, non possono sempre essere paragonati con quanto si verifica nell'uomo, in cui oltre ai fatti di reazione individuale, che possono imprimere variazioni notevoli ai quadri morbosi, si ha sempre a che fare con cause multiple ed attive in diverse proporzioni e che dànno perciò fisionomie sempre piuttosto diverse al complesso sintomatico. Tuttavia i fenomeni che noi abbiamo ottenuto coll' una e coll' altra specie di germi hanno dei caratteri così netti, che è sempre possibile fare un raffronto tra i fatti sperimentali ed i fatti clinici e stabilire, almeno in modo approssimativo, la parte che all' uno od all' altro germe più spetta nel determinare i quadri morbosi stessi.

Per ciò che riguarda le forme acute della pellagra (tifo pellagroso), noi torniamo ad affermare quì quanto uno di noi aveva sostenuto l' anno scorso e su cui è ritornato in recenti pubblicazioni, che cioè tutto porta a ritenere che esse sieno determinate dalle forme aspergillari e specialmente dall'*Aspergillus fumigatus*, il quale è capace di determinare negli animali un quadro morboso affatto analogo a quello delle forme pellagrose acute: ricordiamo qui ancora una volta che coll'*Aspergillus fumigatus* in istato di massima virulenza, sia introducendo nell' organismo le spore, sia estraendo da queste i tossici ed iniettandoli negli animali, si produce un complesso di fenomeni a carico dell' apparato neuro-muscolare (tremori, sussulti, rigidità tetaniforme, convulsioni, ecc.) che hanno pieno riscontro collo stato degli individui affetti da tifo pellagroso.

Per le forme croniche a carattere depressivo, con mancanza di fenomeni di eccitamento, ci sembra di trovare il riscontro dei fatti che vi predominano con quelli che si osservano sperimentalmente negli animali sottoposti all' intossicazione penicillare in genere e specialmente della varietà *A*. Qui infatti abbiamo visto gli animali presentare fenomeni di abbattimento generale, deperimento organico, debolezza muscolare gravissima, diarree, ecc.

I fenomeni invece prodotti dalla 2ª varietà di penicillo assomigliano piuttosto a ciò che si osserva nelle forme subacute di pellagra. Infatti si hanno sperimentalmente fatti di eccitamento muscolare, con esagerazione dei riflessi, lieve stato

spasmodico della muscolatura, eccitamento psicomotorio, ecc.; fenomeni tutti che si osservano nelle forme subacute della pellagra, in cui sono frequenti gli stati di eccitamento non molto intenso, con esagerazione dei riflessi, paraparesi spastica, tremori muscolari, ecc. Torniamo qui ad insistere, perchè il fatto è fondamentale, sulla mancanza dei sussulti e della rigidità muscolare tetaniforme, che sono caratteristici del tifo pellagroso.

Notiamo qui inoltre che pur mettendo in luce l' importanza del penicilli nelle forme croniche e subacute della pellagra, non intendiamo affatto di escludere o diminuire la parte che devono avere i tossici provenienti dagli Aspergilli. Noi ricordiamo qui i quadri di intossicamento analogo che producono gli Aspergilli *flavescens e niger*, nonchè il *fumigatus* stesso quando sia attenuato per la stagione, per l' età, o, artificialmente, pel calore. Non è possibile fare, allo stato attuale delle nostre cognizioni delle distinzioni minute e sottilizzare, attribuendo nell' uno e nell' altro caso i fenomeni morbosi esclusivamente all' una o all' altra specie di germe.

Molto probabilmente in queste forme di pellagra si tratta di fatti determinati dall' associazione delle diverse varietà di germi, con prevalenza di azione dell' uno o dell'altro nei diversi casi e quindi con complessi sintomatologici differenti ed a decorso più o meno rapido: un quadro unico in cui gli episodi sarebbero segnati dalla prevalenza dell' uno o dell' altro fattore.

Da queste forme si distaccherebbe il tifo pellagroso nelle sue varietà determinato degli Aspergilli, specialmente dal *fumigatus* allo stato di massimo potere patogeno che si ha in primavera ed in estate.

Anche i reperti anatomo-patologici verrebbero in sostegno di questo concetto generale. Infatti le gravi lesioni intestinali di forma acuta con forte stato irritativo della mucosa che si trovano costantemente nel tifo pellagroso, non si ottengono che negli animali sottoposti alla nutrizione con sostanze infette dagli Aspergilli (*fumigatus e flavescens*).

Colla nutrizione invece di sostanze alimentari contenenti il Penicillo glauco, sia dell' una che dell' altra varietà, le lesioni del tubo gastro-enterico sono molto più limitate ed hanno una tendenza ad assumere un decorso cronico. Infatti noi abbiamo visto che di solito si aveva un mediocre stato congestivo della

mucosa e delle pareti gastro-intestinali con lieve quantità di catarro: solo eccezionalmente i fenomeni assunsero un carattere più nettamente infiammatorio, ed anche allora erano limitati allo stomaco ed alle prime porzioni del tenue, ed erano sempre di gran lunga inferiori a quelli prodotti dalla nutrizione aspergillare.

Tali fatti hanno un riscontro nelle forme croniche e subacute della pellagra, ma su queste ritornerà presto uno di noi con ricerche apposite eseguite sui polli.

E in rapporto alle lesioni intestinali è anche a notare che mentre le spore degli Aspergilli e specialmente del *fumigatus* assai facilmente attraversano le pareti intestinali e vanno a localizzarsi nelle diverse parti dell' organismo, tale fatto non si osserva invece mai per le spore penicillari. E per questo, mentre in conseguenza della nutrizione aspergillare e del conseguente ingresso in circolo delle spore, si hanno focolai di pleurite e peritonite siero-fibrinosa, processi flogistici ed emorragici nei polmoni e negli altri organi, per la nutrizione penicillare mancano costantemente queste lesioni a distanza.

Tali fatti hanno riscontro appunto nelle forme acute della pellagra, in cui dai polmoni, dagli essudati pleurici, pericardici e meningei e dalle ghiandole mesenteriche si possono isolare gli Aspergilli in coltura pura, mentre costantemente è mancata, nonostante i ripetuti esami colturali, la presenza in essi delle forme penicillari. Anche le lesioni del sistema nervoso, ed in modo speciale del midollo spinale, che si osservano negli animali trattati coi tossici aspergillari e penicillari, meritano una particolare considerazione.

Come risulta dalle recenti ricerche eseguite in questo Laboratorio dal Dott. Pighini, in seguito all'iniezione dei tossici aspergillari, si hanno, specialmente nell'area dei fasci piramidali, delle degenerazioni primarie costanti ed intense accompagnate da gravi fenomeni vasomotori: lesioni che possono raggiungere il grado di incipiente sclerosi, quando, per l'introduzione di cariossidi infette, i cani sono per un tempo più lungo mantenuti sotto l' azione del tossico aspergillare. Tali fatti per la sede loro hanno una perfetta corrispondenza con quelli che le ricerche di Tonnini di Tuchzek e di Belmondo hanno dimostrato nelle forme di pellagra in genere e specialmente nelle forme acute. Usando invece i tossici penicillari, sia per via gastrica, che per iniezione diretta, tali fatti mancano costantemente se si usa il tossico della

1.ª varietà di Penicillo: si hanno solo nella metà circa dei casi ed anche allora molto meno intense, quando si usano i tossici dell' altra varietà.

Questi fatti vengono sempre più a dimostrare che la genesi dei vari fenomeni clinici e delle diverse lesioni anatomo-patologiche che si riscontrano nella pellagra, sono legate a proprietà patogene specifiche di germi affini.

Un fatto di cui bisogna anche tenere conto per la genesi delle varie forme di pellagra è quello del diverso grado di tossicità delle spore dei diversi ifomiceti in questione e della quantità che è quindi necessaria per determinare i fenomeni di intossicamento caratteristici delle diverse specie di germi.

Come abbiamo visto è risultato da tutte le esperienze da noi praticate coi penicilli (sia introducendo direttamente le spore nell' organismo, che colla nutrizione e coll' iniezione dei tossici) che di solito le quantità necessarie, anche della varietà più tossica, sono in genere molto maggiori di quelle che occorrono cogli Aspergilli e specialmente coll' *Aspergillus fumigatus*. Basti ricordare a tale proposito che introducendo nel cavo peritoneale di una cavia una cariosside di mais infetto con *Aspergillus fumigatus* si ha di solito la morte in 24-30 ore; mentre le cavie tollerano impunemente l' introduzione di 8-10 cariossidi infette di Penicillo sia dell' una che dell' altra varietà.

Per determinare fenomeni acuti sarebbero quindi necessarie quantità enormi di germe, mentre noi sappiamo che per l' uomo l' inquinamento del mais e della farina non è mai di un grado così notevole. Per l' *Aspergillus*, dato il suo altissimo potere patogeno, questa contraddizione cessa di esistere.

E anche un altro fatto merita pure speciale considerazione. Noi abbiamo potuto frequentemente osservare nel nostro Istituto (e tutti i lavori che trattano della pellagra citano casi consimili) che in individui entrati con sintomi lievi di pellagra si ha talora, anche dopo parecchi giorni, lo scoppio dei fenomeni acuti, quantunque siano stati sospesi completamente i cibi contenenti sostanze tossiche pellagrogene e gli ammalati siano stati posti in migliori condizioni di resistenza organica. È in questi casi assolutamente impossibilile ammettere che si tratti di tossici di origine penicillare, poichè dalle nostre esperienze e da quelle di Di Pietro risulta che le spore, sia introdotte direttamente nell'organismo che nel tubo gastro-enterico, si liberano con grande rapidità della loro sostanza

tossica; e d'altra parte non è possibile che nell'organismo, tanto nei tessuti dove non furono però mai riscontrate, quanto nel tubo gastro-enterico, si trovino delle spore penicillari in quantità sufficiente a determinare fenomeni così imponenti e così rapidamente progressivi. È quindi logico pensare in tali casi alle spore aspergillari, le sole capaci di localizzarsi nei tessuti e di esercitarvi, dopo un periodo di tempo più o meno lungo, la loro attività. Le ricerche di Ceni colle cariossidi aspergillari dimostrano infatti che negli animali inoculati (cani, scimmie, pecore, conigli, ecc)., si ha lo scoppio dei fatti acuti solo dopo parecchi giorni: quanto alla vitalità delle spore stesse nell'organismo animale essa si mantiene per un tempo certamente molto lungo, stando ai risultati di alcune ricerche in corso.

Rimane infine a considerare il ciclo biologico di sviluppo delle forme aspergillari e delle forme penicillari, e vedere i rapporti che ha colle fasi annuali dell' endemia pellagrosa.

Il rapporto stretto fra il ciclo di sviluppo degli Aspergilli e delle forme acute di pellagra era già stato dimostrato dalle ricerche di Ceni, in seguito alle quali è risultato che il periodo di esacerbazione primaverile dell' endemia pellagrosa, caratterizzato dalla comparsa delle forme più acute (tifo pellagroso), coincide col periodo di evoluzione biologica dell' *Aspergillus fumigatus* in cui il germe presenta la massima virulenza, mentre il secondo periodo di esacerbazione autunnale coincide coll' evoluzione biologica del l' *Aspergillus flavescens.*

Per i Penicilli noi possiamo in linea generale ammettere che la varietà *A*, a sviluppo prevalente nelle stagioni fredde sia specialmente in rapporto colle forme croniche, mentre la varietà *B*, che si sviluppa specialmente nelle stagioni calde, sia in rapporto colle forme subacute apiretiche, che in questi periodi sono specialmenti frequenti.

Ripetiamo che, specialmente per la parte che riguarda le forme croniche e subacute, si tratta solamente di concetti generali e che siamo ben lontani dal volere stabilire in modo assoluto che questa o quella forma di pellagra cronica e subacuta sia in rapporto esclusivamente coll' una o coll' altra forma di ifomiceto da noi studiata. Di sicuro possiamo solo dire che la preponderanza dell' una o dell' altra forma può essere quella che dà un carattere speciale ai singoli quadri clinici.

I risultati di queste ricerche, quindi, mentre vengono a mettere in luce nuovi fatti che servono a convalidare l' importanza del Penicillo glauco nella pellagra, nello stesso tempo vengono a mettere in evidenza sempre maggiore l' importanza degli Aspergilli, e ciò sia per il grado patogeno del germe, di gran lunga superiore a quello dei penicilli, sia per la loro grande diffusione in natura, che non solo non è inferiore a quelli dei penicilli, ma in certi periodi dell' anno è anche superiore.

## CONCLUSIONI.

Le conclusioni che dal nostro lavoro si possono trarre sono le seguenti:

1. Due varietà di Penicillo glauco, che sembrano le più diffuse in natura, sono dotate di uno spiccato potere patogeno avente caratteri diversi ed opposti: una, la varietà *A*, produce fenomeni a carattere depressivo (abbattimento generale, rilasciamento muscolare con diminuzione del tono, ecc.): l' altra, la varietà *B*, invece, dà luogo a fatti di eccitamento neuromuscolare (esagerazione dei riflessi, tremori generali, stato spasmodico della muscolatura, ecc.)

2. Le proprietà patogene di ambedue le varietà si manifestano coi caratteri suddescritti, sia introducendo direttamente il germe nell' organismo (via endovenosa od endoperitoneale), che somministrandolo per la via gastro-enterica.

3. Gli stessi effetti specifici per le due varietà si ottengono anche estraendo i tossici colla bollitura in alcool ed iniettandoli agli animali.

4. I principî tossici sono legati esclusivamente al germe, sia al micelo che alla spora, ma sono di gran lunga prevalenti in questa.

5. I principî tossici non hanno rapporto coi composti fenolici del Gosio che i germi possono produrre a spese dei mezzi colturali *.

* Naturalmente, e noi insistiamo a rilevarlo, i risultati nostri e le conclusioni si riferiscono ai composti fenolici, come prodotto del ricambio materiale del germe e messi in evidenza col metodo di Gosio. E questo diciamo dopo la recente pubblicazione del Di Pietro 20 (comparsa mentre il nostro lavoro era in corso di stampa), il quale avrebbe dimostrato che la sostanza tossica della sua varietà di Penicillo glauco è costituita da un glucoside combinato con un corpo fenolico,

6. Per determinare fenomeni evidenti occorrono quantità considerevoli di materiale, maggiori però per la varietà *B* che per la varietà *A*. Iniettando i Penicilli direttamente nell' organismo animale non si possono ottenere fenomeni di intossicamento se non con quantità considerevoli e corrispondenti alla quantità necessaria a dare una dose attiva di estratto alcoolico. Le quantità necessarie sono sempre molto inferiori a quelle dell' *Aspergillus fumigatus,* specialmente se questo viene inoculato direttamente negli animali.

7. Negli animali morti in seguito a nutrizione penicillare non si è potuto dimostrare il passaggio delle spore attraverso le pareti intestinali e la diffusione loro nell' organismo.

8. Le reazioni locali hanno gli stessi caratteri, sia introducendo direttamente le spore, che iniettando i tossici. Per la varietà *A* sono però di gran lunga più intense che per la varietà *B*. Sia la spora che il micelo penicillare d' ambo le varietà vengono facilmente eliminati dall' organismo in seguito a una rapida fagocitosi. Colla nutrizione le lesioni gastro-intestinali sono sempre poco intense e di gran lunga inferiori a quelle prodotte dall' *Aspergillus fumigatus.*

9. Nel sistema nervoso centrale si ha un'intensa congestione della pia cerebrale: il midollo spinale, solo per la varietà *B*, presenta talvolta delle degenerazioni primarie, che mancano invece sempre per la varietà *A*.

10. È indiscutibile l'importanza di questi parassiti nell'etiologia della pellagra; ma dato il loro modo di agire e le loro qualità patogene, ben diverse da quelli dell'*Aspergillus fumigatus,* la loro azione si può esplicare solo determinando dei fenomeni di intossicazione progressiva per i tossici che mettono in libertà nel tubo gastro-enterico.

il quale con un metodo speciale potrebbe essere scisso dal glucoside stesso e messo in evidenza col percloruro di ferro (col quale dà una reazione verde-erba caratteristica), anche quando il metodo di Gosio dà risultati negativi. Noi cominciamo col notare che il Di Pietro viene già a confermare quanto le nostre ricerche hanno dimostrato, che cioè non vi è un rapporto tra composti fenolici e potere patogeno nel senso sostenuto dal Gosio, poichè egli ha spesso trovati mancanti i corpi fenolici nel mezzo nutritivo, quando il germe ne conteneva grandi quantità. Riguardo poi a ciò che egli sostiene che si possa parlare di sostanza pellagrogena (mais, formaggio, ecc.) solo quando si possa dimostrare la speciale reazione verde dovuta alla sua varietà di Penicillo, noi non vogliamo per ora entrare nei particolare della questione: ci basti solo ricordare le spiccate proprietà patogene della 1a varietà di Penicillo glauco, che, stando alle conclusioni del Di Pietro stesso e come del resto risulta anche dalle nostre ricerche, è sempre risultata priva di composti fenolici.

# BIBLIOGRAFIA.

1. Grohe. Experimente über die iniection der Pilzsporen von *Aspergillus glaucus und Penicillum glaucum* in dem Blut und den sërosen Säcke. *Berliner klin. Wochenschrift.* 1870 pag. 8.

2. Block. Beitrag zur Kenntniss der Pilzbildung in den Geweben des thierischen Organismus. *Tesi de Stettin.* 1880.

3. Grawitz. Beitrage zur systematischen Botanik der pflanzischen Parasiten. *Virchow's Archiv.* 1877, T. LXX.

4. Grawitz. Uber Schimmelvegetationen in thierischen organismus. *Ibidem.* T. LXXXI.

5. Koch und Gaffky. Mittheilungen aus dem Kaiserl. Gesundheitsamtes '81.

6. Lichtheim. Ueber pathogene Schimmelpilze. Die Aspergillusmykosen. *Berliner klin. Wochenschrift.* 1882.

7. Lombroso. Trattato profilattico e clinico della pellagra. 1892.

8. Cattaneo. Geografia nosologica dell' Italia del Sormani. 1881.

9. Monti e Tirelli. Atti dell' Accademia dei Lincei. 1890.

10. De Giaxa. Contributo alle cognizioni sull' etiologia della pellagra. *Annali d' Igiene.* 1892.

11. Gosio. Ricerche batteriologiche e cliniche sulle alterazioni del mais. *Riv. d' Igiene e Sanità pubblica.* 1896.

12. *l. c.*

13. Gosio e Ferrati. Sull' azione fisiologica dei veleni del mais. *Riv. d' Igiene e Sanità pubblica.* 1896.

14. Ferrati. Alcuue ricerche sulla tossicità del mais invaso da *Penicillum glaucum. Policlinico.* Sez. Medica. 1900, N. 17.

15. Di Pietro. Sui veleni di alcune muffe. *Annali d' Igiene.* 1902.

16. Antonini e Ferrati. Sulla tossicità del mais invaso da *Penicillum glaucum. Archivio di Psichiatria, scienze penali ecc.* Vol. XXIV; f. V-VI. 1903.

17. Ceni. Gli Aspergilli nell' eziologia e nella patogenesi della pellagra. *Riv. sper. di Freniatria.* 1902, fasc. 2.

Ceni und Besta. Ueber die Toxine von *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus flavescens,* und deren Beziehungen zur Pellagra. *Centralblatt für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anat.* 1902.

Id. id. Principii tossici degli Aspergilli *fumigatus* e *flavescens. Riv. sper. di Freniatria.* 1902, fasc. IV.

Ceni. L' azione del succo enterico sulle spore aspergillari in rapporto colla genesi della pellagra. *Ibidem.* 1902, fasc. IV.

Id. Ueber die Lokalisation der Aspergillussporen in den Mesenterialdrüsen der Pellagrakranken. *Centralbl. f. Pathol. und Pathologische Anatomie.* 1903.

Id. Nuove ricerche sullo sviluppo degli Aspergilli in rapporto colla diffusione della pellagra. *Ibidem.* 1903, fasc. I.-II.

Id. Localizzazione delle spore aspergillari nelle glandole mesenteriche dei pellagrosi e loro consecutiva attenuazione. *Riv. sper. di Freniatria.* 1903, fasc. III.

Ceni e Besta. L' azione degli agenti esterni sopra le spore aspergillari in rapporto colla patogenesi della pellagra. *Ibidem.* 1903, fasc. III.

18. Pighini. Degenerazioni primarie da tossici aspergillari. *Riv. sper. di Freniatria.* 1903, fasc. 3.

19. Gosio. Per l' etiologia della pellagra. *Rivista pellagrologica italiana.* 1903, N. 3.

20. Di Pietro. Intorno al « Penicillo tossico ». *Rivista pellagrologica italiana.* 1903, N. 6.

---



Al Chiarissimo [illegible]
in segno di alta stima
l'autore



RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXX. Fasc. I.

NUOVE RICERCHE

# SULLA PELLAGRA NEI POLLI

PEL

DOTT. CARLO CENI
MEDICO SETTORE E DOCENTE DI NEUROPATOLOGIA



*(Con una Tavola)*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1904.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXX. FASC. I.

NUOVE RICERCHE

# SULLA PELLAGRA NEI POLLI

PEL

DOTT. CARLO CENI
MEDICO SETTORE E DOCENTE DI NEUROPATOLOGIA



*(Con una Tavola)*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1904.



LIBRARY

(616. 96 / 619. 5)

È noto come Lombroso sottoponendo i polli alla nutrizione di mais guasto abbia potuto riprodurre tutti i fenomeni, caratteristici della pellagra. Occorrono però secondo Lombroso parecchi mesi di nutrizione per ottenere questi fenomeni; giacchè nel primo periodo i polli non solo non ne risentono danno alcuno, ma di solito aumentano anche di peso. La comparsa dei sintomi d'intossicamento maidico in alcuni casi sarebbe seguita dalla morte, mentre in altri casi gli animali possono in seguito rimettersi e anche aumentare in peso temporaneamente, per poi ricadere ripresentando gli stessi fenomeni con una nuova diminuzione di peso in precedenza della morte.

Così, mentre la massima parte dei polli esperimentati dal Lombroso sono morti in un periodo di tempo inferiore a un anno circa, uno di questi morì invece dopo 14 mesi e un altro dopo 2 anni d'alimentazione.

A questo genere d'esperienze sono ricorso io pure per i miei studi sull'ereditarietà nella pellagra, sottoponendo fin dal 1899, alla nutrizione di mais avariato 16 polli, (14 galline e 2 galli) 7 dei quali furono poi sostituiti nell'anno susseguente da altri 4 polli ( 1 gallo e 3 galline) nati da uova provenienti dalle prime galline.

Il modo di comportarsi di tutti questi polli alla nutrizione di mais avariato, tranne alcune diversità individuali in rapporto colla razza più o meno resistente, è sempre stato presso che identico; essendo apparsi i fenomeni caratteristici del così detto intossicamento maidico, nel medesimo grado e coi medesimi caratteri tanto nel primo, quanto nel secondo gruppo; il che starebbe a dimostrare fin d'ora che i figli nati da pellagrosi non ereditano nessuna immunità specifica contro la pellagra, ma possono divenir pellagrosi a loro volta come i procreatori.

Come già altrove ebbi a dire [1], i fenomeni presentati dai polli da me sottoposti all' alimentazione costante ed esclusiva di mais fortemente avariato, corrispondono a un di presso a quelli osservati da Lombroso; presentando come quelli delle oscillazioni e delle crisi meritevoli, come vedremo, della massima considerazione. Però i miei soggetti presentarono una più lunga resistenza a questa alimentazione; il che mi permise di studiare meglio i rapporti tra l' insorgenza e il decorso dei fenomeni morbosi nei diversi periodi dell' anno, venendo così tali esperienze ad acquistare un' importanza sempre maggiore nella questione dell' etiologia e patogenesi della pellagra.

In tutti questi polli, la comparsa dei fenomeni d' intossicamento, e il loro aggravarsi, hanno sempre presentato delle oscillazioni periodiche molto regolari e corrispondenti sempre a ben determinate epoche dell' anno.

I primi sintomi della malattia camparvero sempre coll' annunciarsi della primavera, e progredirono poi costantemente d' intensità di pari passo coll' avansarsi della primavera e coll' avvicinarsi dell' estate.

I sintomi ripetutisi ogni anno in tutti i polli in discorso furono: la diarrea, non di raro sanguinolenta, la perdita progressiva delle piume che in alcuni casi fu quasi completa, la comparsa degli eritemi cutanei caratteristici, e il periodico dimagrimento rapido e così notevole che essi perdevano perfino più della metà del loro peso.

Questi fenomeni raggiungevano il loro massimo d' intensità sempre verso il Maggio, e rimanevano poi quasi invariati fino verso la prima metà dell' estate; dalla qual epoca le condizioni degli animali entravano in una fase di miglioramento generale e progressivo, segnalato dalla scomparsa della diarrea e degli eritemi, dall' aumento di peso e dal ricoprirsi di piume nelle parti denudate.

Questo miglioramento ha però quasi sempre presentato una breve fase di recrudescenza verso la seconda metà dell'autunno; ma si trattava allora di fenomeni piuttosto lievi e caratterizzati sopratutto da una leggera diminuzione del peso o anche da un

[1] Ceni. Sul potere riproduttivo e sull'ereditarietà nella pellagra sperimentale. *Rivista Sper. di Freniatria*. Vol. XXVII 1901.

Id. Gli Aspergilli nella etiologia e patogenesi della pellagra. *Rivista Sper. di Freniatria*. Vol. XXVIII 1902.

semplice arresto di quello stato di miglioramento, che nei 2-3 mesi precedenti era apparso progressivo.

Tutti i polli a ogni modo, sorpassata questa seconda fase autunnale, coll'avvicinarsi dell'inverno miglioravano così rapidamente, che già verso la fine di Novembre di solito si potevano considerare come completamente rimessi in condizioni normali, sia nel loro aspetto generale, sia nel loro peso.



Gruppo I° - Polli nutriti da un anno circa con mais guasto. - Fase di recrudescenza dei fenomeni pellagrosi — Fotografia del 26 Aprile 1900.

Anche le galline che durante la primavera successiva avevano presentato i fenomeni più gravi del così detto intossicamento maidico, al punto da perdere 700-800 gr. e più in peso, durante la stagione fredda si rimettevano completamente, riacquistando le piume e ingrassando fino a raggiungere 1600-1800 gr. in peso, e ciò sebbene si continuasse costantemente l'alimentazione di mais avariato.

Su questa regolare periodicità con cui apparvero i fenomeni pellagrosi nei polli sottoposti alla nutrizione di mais avariato, e sull' epoca della comparsa delle fasi di recrudescenza primaverile e autunnale, le quali coincidono pienamente colle fasi di recrudescenza dell' endemia pellagrosa nell' uomo, insisto qui ancora una volta, venendo esse, secondo me, a dimostrare sempre più come la pellagra si debba ritenere in rapporto col ciclo biologico di alcune forme di parassiti vegetali (Aspergilli e Penicilli), durante il quale tali germi sarebbero anche dotati del massimo delle loro proprietà patogene, come già più volte ebbi a sostenere.

I polli, benchè nutriti con mais fortemente avariato, presentarono, ripeto, una resistenza individuale assai diversa tra di loro, e la loro morte, avvenuta a distanza notevole nei singoli casi, ora fu preceduta da fenomeni acuti caratteristici, molto analoghi a quelli descritti dal Lombroso (sitofobia, denutrizione forte e rapida, diarrea spesso emorragica, crampi e contratture, fenomeni durati in media da 10 a 15 giorni), ora invece fu preceduta da fenomeni di cachessia progressiva.



Gruppo II° - Polli nutriti da più di due anni con mais guasto. - Fase di remissione dei fenomeni pellagrosi. — Fotografia del 12 Dicembre 1902.

I fatti acuti si osservarono in 5 casi: e di questi il 1° morì nell'Agosto 1900 dopo un anno circa di alimentazione, il 2° morì nell' Aprile 1901, dopo circa due anni d' alimentazione. Entrambi appartenevano al primo gruppo e furono già da me altrove descritti in tutti i loro particolari [1].

Il 3° pollo, appartenente invece al secondo gruppo, morì nel Giugno 1902, cioè dopo due anni circa d' alimentazione, e il 4° appartenente al primo gruppo, morì nell' Agosto dello stesso anno, e quindi dopo più di tre anni d' alimentazione. Questi due ultimi al momento della morte pesavano rispettivamente 670 e 810 gr., mentre la media del loro peso durante gli inverni passati in osservazione, era stata di 1270 e di 1700 gr.

Il 5° pollo morì nell' Agosto 1903, cioè dopo circa 4 anni d' alimentazione, giacchè questo apparteneva al primo gruppo. Il suo peso era di 730 gr.; mentre la sua media invernale era stata di 1500 gr.

1 Ceni. Lavori citati.

I polli morti con fenomeni di cachessia progressiva furono 4: il 1.º di questi, appartenente al primo gruppo, morì nell' Ottobre 1902, cioè dopo più di tre anni d' alimentazione. Questo pesava 750 gr., mentre la media del suo peso invernale era stata di 1350 gr.

Il 2.º, appartenente al secondo gruppo, morì ai primi d'Ottobre 1903, cioè dopo più di tre anni d'alimentazione. Esso pesava 970 gr., mentre la media del suo peso invernale era stata di 1700 circa.

Il 3º e il 4º appartenevano pure al secondo gruppo e morirono entrambi nel Novembre 1903, cioè dopo circa tre anni d'alimentazione. Questi due pesavano 1140 e 1120 gr., mentre la media del loro peso invernale era stata di 1400 e 1900 gr. (gallo).

Dei polli sottoposti all' alimentazione di mais avariato attualmente ne vive ancora uno del primo gruppo e in buonissime condizioni, come lo fu sempre nelle precedenti fasi invernali. Gli altri tre polli del primo gruppo furono usufruiti per ricerche complementarie, come vedremo più avanti.

Riassumo ora in breve il reperto macro e microscopico, non chè quello batteriologico risultato all' autopsia, prima dei polli morti con fenomeni acuti e poi di quelli morti con fenomeni di cachessia.

Rimando alle memorie su citate pel reperto avuto all' autopsia dei primi due casi.

L' autopsia (eseguita sempre poche ore dopo la morte) degli altri tre casi morti con fenomeni acuti diede dei reperti presso che eguali ai precedenti e caratterizzati appunto da atrofia notevole di tutte le masse muscolari, da congestione di tutti gli organi interni e da enterite cronica riacutizzata. In questi ultimi casi esisteva però inoltre una pericardite fibrinosa adesiva e acuta, sulla quale qui intendo richiamare l' attenzione in modo particolare, sia per la novità del reperto, sia per la sua importanza.

I fenomeni più tipici e più gravi di pericardite fibrinosa acuta furono però osservati specialmente nei due polli morti nel 1902 (casi 3º e 4º); mentre nel 5º pollo tale lesione era lieve e si può dire iniziale. Nei primi due casi il pericardio parietale era congesto, opacato, ispessito e aderente allo sterno per numerose pseudomembrane di recente formazione. La superficie interna del pericardio parietale, nonchè quella del viscerale era ricoperta da abbondante essudato fibrinoso, di color grigiastro, filante e di aspetto gelatinoso, che rendeva qua e là aderenti i due foglietti.

Mancava però traccia di essudato sieroso nel cavo pericardico in questi due casi; mentre nel 5° caso esisteva una piccola raccolta di essudato siero-sanguinolento ed era invece qui assai scarso l' essudato fibrinoso. Il miocardio è sempre stato flaccido e ridotto assai di spessore. Nulla di notevole si è presentato invece all' endocardio.

Numerose seminagioni furono fatte dai varî organi di questi tre casi, sia in mezzi colturali comuni, sia nel liquido di Raulin.

Le seminagioni fatte dal sangue e dal fegato rimasero costantemente negative in tutti i mezzi di coltura. Le seminagioni fatte in liquido Raulin con copioso contenuto intestinale, in un caso (caso 3°) diedero luogo ad abbondante sviluppo di *Aspergillus fumigatus* (8 tubi positivi su 10); negli altri due casi invece non diedero luogo allo sviluppo di alcun ifomiceto importante.

Le seminagioni fatte dall' essudato pericardico coi mezzi colturali comuni rimasero sempre sterili; quelle fatte nel liquido Raulin, nel 3° caso diedero luogo a 4 colture pure di *Aspergillus fumigatus*, quelle del 4° caso a 3 colture e quelle del 5° a 5 colture dello stesso parassita, sopra dieci tubi seminati per ogni caso. L' isolamento costante dell'*Aspergillus fumigatus* e in coltura pura non si ebbe dunque in questi che dall'essudato pericardico.

Non meno importante è stato il reperto dell' autopsia dei 4 polli morti con fenomeni di cachessia progressiva dopo 3-4 anni di nutrizione di mais avariato.

In generale questi polli presentavano una atrofia notevole delle masse muscolari, (comprese quelle del ventricolo), scomparsa completa del tessuto adiposo, ed un emaciamento caratteristico della cute.

Tanto i due polli morti nell'Ottobre 1902 e 1903, quanto i due morti verso la metà del Novembre 1903 erano ancora notevolmente spennacchiati, a un di presso come lo erano nell'ultima estate; mentre a quest'epoca negli altri anni si erano già, si può dire, completamente rimessi e ricoperti di piume. L' intestino di questi quattro polli era notevolmente atrofico e con fatti d'enterite cronica diffusa. In un caso solo l' intestino era congesto e anche in questo lievemente.

Nell' ultima gallina morta nel Novembre 1903 e che pesava 1140 gr., si riscontrarono inoltre numerose e grosse cisti ovariche del peso complessivo di 490 gr. Nel gallo morto pure in questo mese, si riscontrò una peritonite fibrinosa di antica

data, che in varî punti rese impossibile lo svolgimento delle anse intestinali.

Nessun fatto degno di nota si ebbe in tutte queste forme croniche a carico degli organi respiratorî. Il fegato invece presentava in due casi i segni marcati d'una degenerazione grassa.

Due galline (caso 2° e 3°) presentavano inoltre un notevole ispessimento diffuso del pericardio parietale e degli ispessimenti a forma di piccole placche tendinee sul pericardio viscerale. In ambo i casi i due foglietti erano uniti tra di loro per mezzo di aderenze robuste e organizzate, estese tanto alla base, quanto alla punta del cuore [1]. Nessuna traccia di essudato nel cavo pericardico.

Il miocardio è sempre stato flaccido e notevolmente atrofico.

In due polli mancavano invece i segni d' una lesione pericardica e solo esistevano la flaccidezza e l'atrofia del miocardio.

Le ricerche batteriologiche fatte in questi quattro casi diedero risultato sempre negativo.

Riassumendo quindi noi vediamo che su nove polli morti in seguito ad alimentazione di mais fortemente avariato e durata di continuo in media da 2 a 4 anni, in 5 casi la morte fu preceduta da fenomeni acuti e caratteristici; mentre in 4 casi la morte avvenne in seguito ad uno stato di cachessia cronica progressiva.

Tutti i polli morti con fenomeni acuti presentavano fatti gravi di deperimento generale, enterite subacuta e congestione intensa degli organi interni. Di più, uno di essi presentava i segni di un evidente processo pneumonico acuto [2] e tre infine presentavano una tipica pericardite fibrinosa acuta. Dei quattro casi morti di cachessia, oltre ai fenomeni generali comuni (enterite, atrofia, ecc.) uno presentava degenerazione cisto-ovarica, un altro presentava i fatti di una peritonite adesiva pregressa e due i residui di una pericardite pure pregressa.

È ora su questo ultimo reperto anatomo-patologico, non costante, ma frequente in polli che già da 2-4 anni presentavano i sintomi caratteristici del così detto intossicamento maidico cronico, e morti poi con fenomeni acuti, insorti d' improvviso e che corrispondono a quelli della pellagra acuta, che

[1] Si conservano i pezzi anatomici.

[2] Vedi caso descritto nella memoria « Gli Aspergilli nell'etiologia e patogenesi della pellagra » *Rivista sper. di Freniatria* 1902.

io, ripeto, intendo richiamare l' attenzione in questa nota in modo particolare, per l' importanza speciale che può avere nell' etiologia e patogenesi della pellagra.

Già più volte ho dimostrato sperimentalmente come le spore dell' *Aspergillus fumigatus* allo stato di loro massima tossicità, qualora giungano nel tubo enterico, sono capaci di determinare un' enterite acuta e di entrare in seguito in circolo attraversando le pareti intestinali. Il Gosio stesso, in una nota recente nella quale si prefigge apertamente di combattere l' importanza da me attribuita agli Aspergilli nell' etiologia della pellagra, conferma tuttavia sperimentalmente il passaggio delle spore aspergillari attraverso l'intestino in animali sottoposti ad una alimentazione infetta [1].

Dimostrai inoltre nelle citate memorie come le spore aspergillari entrate in circolo, in causa della loro notevole refrattarietà alla reazione fagocitaria, sieno difficilmente eliminate dal l' organismo e possano così localizzarsi nei vari organi e tessuti, e in modo particolare nelle sierose (peritoneo, pleure, ecc.) dando luogo a caratteristici processi infiammatorii.

Per cui credo ora logico l' ammettere che anche la pericardite riscontrata nei nostri polli sia da ritenere di natura aspergillare e dovuta più propriamente alle spore dell'*Aspergillus fumigatus* isolato dagli essudati su descritti.

È poi troppo evidente il rapporto di causa e d' effetto tra questo fenomeno patologico e la nutrizione di mais guasto alla quale i polli erano da tempo sottoposti, perchè io insista qui ancora su di esso. Ricorderò qui invece l' analogia delle lesioni pericardiche su descritte con quelle da me riscontrate in alcuni pellagrosi morti con sintomi acuti o sub-acuti e localizzate pure alle sierose (pleure, pericardio, meningi); sembrandomi il fatto più che eloquente per dimostrare una volta ancora l'importanza degli aspergilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra.

Potendo disporre d' adatto materiale di studio volli spingere più oltre le mie ricerche su questo argomento, sia allo scopo di studiare meglio la natura del processo morboso, sia per stabilire sperimentalmente il vero valore delle lesioni pericardiche in rapporto specialmente colla crisi acuta che causò la

1 Gosio. Per l'etiologia della pellagra. *Rivista pellagrologica italiana*, N. 3. Maggio 1903.

morte dei polli resi pellagrosi. La necessità di queste nuove ricerche era poi maggiormente sentita pei risultati a cui ero giunto colle mie esperienze precedenti sui polli, e che sembrerebbero a tutta prima in contraddizione con questi ultimi; avendo con quelli dimostrato come i gallinacei in genere presentino una notevole resistenza ai tossici aspergillari, specialmente in confronto ai mammiferi.

Per questo tentai riprodurre anzi tutto la pericardite nei polli sani, inoculando in essi direttamente nel cavo pericardico piccole dosi di spore aspergillari, allo scopo di stabilire approssimativamente il modo di reagire di questo alla dose minima mortale del parassita. In secondo luogo ripetei l' esperimento su alcune delle galline che da 4 anni tenevo sottoposte all' alimentazione di mais guasto, come vedemmo più sopra, e ciò per rilevare le possibili varietà nel loro modo di reagire in confronto ai soggetti normali.

L' esperienza fu fatta nel Maggio e nel Giugno 1903, usufruendo dall' *Aspergillus fumigatus* isolato in quei mesi stessi dal cadavere di due pellagrosi e che presentava il massimo di virulenza.

Sei furono le galline adoperate per questa esperienza, delle quali 3 sane, adulte e del peso in media di 1500 gr. l' una; mentre le altre 3 furono scelte tra quelle nutrite da tempo con mais avariato e che a quell' epoca pesavano in media circa 900 gr. l' una e presentavano tutti i fenomeni caratteristici della pellagra cronica. A ciascuna di queste galline mediante un robusto ago cannula si iniettò nel pericardio $^1/_2$ cmc. di una emulsione di spore aspergillari fatta con cinque cariossidi infettate artificialmente ed emulsionate con 10 cmc. d' acqua.

Delle galline di controllo due sopravvissero, e queste presentarono soltanto un lieve deperimento con segni di un malessere generale (durato 5-8 giorni), senza però mai ricusare il cibo.

La terza gallina invece andò sempre più peggiorando; al quindicesimo giorno divenne sitofoba e pochi giorni dopo cominciò a presentare delle contratture e dei crampi al collo e specialmente alle gambe, in modo che non poteva nè sorreggersi, nè camminare. In queste condizioni durò circa due settimane e infine morì, 46 giorni dopo l' iniezione, sotto un accesso convulsivo e in uno stato di forte emaciazione generale. Il suo peso era disceso a 720 gr.

All' autopsia si riscontrò una congestione generale degli organi interni e una pericardite fibrinosa imponente. Il pericardio parietale era diffusamente aderente alla parete toracica e ricopriva lateralmente le masse polmonari. Era congesto, d' aspetto galatinoso caratteristico e fortemente ispessito. Era poi ovunque così aderente al foglietto viscerale da formare una massa unica gelatinosa, friabile e congesta, che in alcuni punti raggiungeva lo spessore di circa un centimetro e più.

Furono fatte abbondanti seminagioni dal sangue, dal fegato e dall' essudato pericardico. Le seminagioni provenienti dal sangue e dal fegato rimasero sterili, sia quelle fatte in brodo comune, sia quelle fatte in liquido di Raulin. Quelle fatte dall' essudato pericardico in brodo comune rimasero pure sterili; mentre quelle fatte in liquido Raulin diedero luogo a numerose colonie di *Aspergillus fumigatus.*

Le galline già pellagrose inoculate colla stessa dose di emulsione di spore aspergillari morirono tutte nel periodo di 2-3 giorni e senza le tipiche contratture e crampi. Queste all'autopsia presentavano un' intensa congestione generale di tutti gli organi e una pericardite acuta incipiente, caratterizzata da un forte stato di congestione e dalla presenza di essudato siero-fibrinoso nel sacco pericardico. Poche aderenze esili e friabilissime univano qua e là i due foglietti.

Fu eseguito l' esame microscopico dell' essudato di questi casi, facendo dei preparati a strisciamento sui vetrini per questi ultimi in cui la morte era avvenuta rapidissima, e facendo invece dei tagli in serie del tessuto patologico organizzato nel caso della gallina vissuta 46 giorni. Anche in questa circostanza si ricorse alla colorazione doppia con tionina e safranina per la proprietà elettiva della prima pel micelio e della seconda per le spore, come già altre volte ho fatto osservare.

In nessuno di questi casi l' esame microscopico potè mettere in evidenza la presenza di forme miceliari del parassita inoculato; mentre dimostrò con chiara evidenza che le spore inoculate erano rimaste tali, senza presentare il minimo segno di evoluzione, di tendenza a svilupparsi e trasformarsi in micelio.

D' un interesse particolare è poi stato il reperto microscopico nel caso della gallina che sopravvisse 46 giorni e che all' autopsia aveva presentato un processo flogistico pericardico diffuso con organizzazione dell' essudato ecc.

Il pericardio presentava ovunque rigogliosa proliferazione ed era ricoperto tanto alla superficie interna, che esterna da abbondante essudato fibrinoso, ricco di vasi sanguigni e linfatici e di cellule d' infiltrazione. Una netta distinzione dei due foglietti non era sempre possibile, data l' intensità e la diffusione del processo infiammatorio, che dal foglietto viscerale si insinuava e si continuava anche tra le fibre miocardiche più superficiali, come era facile desumere specialmente dall' abbondante proliferazione nucleare del tessuto interstiziale.

Il fatto che merita la maggiore considerazione però in questo caso e che dà un' impronta caratteristica al tessuto neoformato era la presenza delle spore aspergillari, non che quella di numerose cellule giganti.

Le spore aspergillari sono riunite in piccoli gruppi quà e là disseminati irregolarmente nel tessuto neoformato. Nessuna di queste spore è inglobata da cellule fagocitarie, ma sono tutte libere e la massima parte appare di forma perfettamente normale e intensamente colorate dalla safranina. Nessuna presenta la minima tendenza ad una trasformazione in micelio; mentre non poche invece appaiono chiaramente in via di dissoluzione, risultando disgregate e molte volte ridotte a piccoli accumuli di sostanza finamente granulare, poco colorabile alla safranina.

Questi gruppi di spore sono poi ovunque circondati direttamente da numerose cellule giganti, che dànno, ripeto, un' impronta caratteristica al tessuto in esame, come vedesi dalle due figure della tavola annessa a questo lavoro.

Le cellule giganti che avvolgono completamente le spore costituendo dei focolai di diversa grandezza e forma, variano assai, alla loro volta, nell' aspetto e nel volume. Le più grosse sono quelle che formano lo strato più interno del focolaio e perciò sono in più diretto rapporto di vicinanza colle spore. Esse molto spesso presentano, come le spore stesse, i caratteri d' un processo regressivo; sono poco colorabili colla tionina, i loro nuclei sono poco distinti e ingrossati e nel protoplasma cellulare si osservano dei vacuoli più o meno marcati. Le cellule giganti di grande diametro ben conservate e con nuclei ben distinti e numerosi (se ne possono contare anche più di 30 per cellula) sono però di solito più abbondanti di quelle in via di regressione. Subito dopo, all' esterno di queste cellule a massimo diametro, segue uno strato di cellule giganti in istato di attività.

Queste sono di varia grandezza, assai ricche di nuclei, e in mezzo ad esse si osservano numerose cellule granulose e abbondanti forme leucocitarie. Il tutto è limitato da uno strato di tessuto connettivale, che avvolge il focolaio in una specie di capsula a forma di tubercolo.

Ribbert, Dieulafoy, Chantmesse, Widal, Rénon ecc. già avevano dimostrato come nella tubercolosi aspergillare il processo di difesa dell' organismo contro l' aspergillo sia identico a quello che si osserva nella tubercolosi comune contro il bacillo di Koch; caratterizzato appunto da un' intensa reazione leucocitaria, dalla presenza di cellule granulari e di cellule giganti. Difficilmente però nei mammiferi, su cui sperimentarono di solito gli autori, si può avere una reazione così tipica e con una formazione così abbondante di cellule giganti come io l' ottenni nel pollo.

Il nostro caso inoltre viene qui ad acquistare un valore speciale anche pel fatto che esso serve a mettere in evidenza l'importanza che ha la spora nel determinare questa particolare reazione, che gli autori invece in genere vogliono spiegare come un semplice processo di difesa contro l' invasione del micelio che si svolge dalla spora. Il nostro reperto dimostrerebbe perciò come sia inesatta la spiegazione data dagli autori alla formazione del tubercolo anche nell'aspergillosi comune; giacchè, ripeto, le spore, per quanto fossero inoculate vitali nel pollo, non trovando in esso un mezzo favorevole per germinare e trasformarsi in micelio, si mantennero sempre tali, pur dando luogo ai fatti sopra descritti.

Le spore aspergillari, ripeto qui ancora una volta, non furono però mai osservate inglobate da alcuna cellula fagocitaria, il che corrisponde completamente ai risultati delle mie ricerche col Besta[1], le quali appunto ci portarono a concludere che le spore dell' *Aspergillus fumigatus*, al contrario di ciò che avviene per le spore dei penicilli, vengono difficilmente eliminate dall' organismo; giacchè la loro distruzione, quando sono allo stato normale, avviene per azione extraleucocitaria. Ciò appare evidentissimo all' esame degli attuali preparati, come vedesi dalla fig. 2.

[1] Ceni e Besta L' azione degli Agenti esterni sopra le spore Aspergillari in rapporto colla patogenesi della pellagra. *Rivista Sperimentale di Freniatria* Vol. XXIX. 1903.

Riassumendo, da questa seconda serie di ricerche sperimentali risultano quindi due fatti di non lieve importanza per ciò che concerne l' etiologia e la patogenesi dei fenomeni acuti, non che delle lesioni anatomo-patologiche riscontrate nei polli che già da tempo presentavano i sintomi caratteristici del così detto intossicamento maidico cronico. Anzitutto da questi ultimi reperti viene dimostrato nel modo più evidente che le spore aspergillari giunte nel pericardio vi possono, anche in quantità minima, dar luogo a un quadro morboso speciale, caratterizzato da una pericardite fibrinosa acuta e letale pei gallinacei, riproducendo così anche il medesimo quadro morboso osservato negli stessi animali sottoposti alla nutrizione di mais guasto.

L' importanza che a questo fatto noi dovremo attribuire nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra nell' uomo mi sembra troppo evidente perchè io debba di nuovo insistere su di esso. Tuttavia non posso qui a meno di ricordare la frequenza con cui furono da me riscontrati dei processi flogistici localizzati alle sierose nei casi di pellagrosi morti con fenomeni acuti e sub-acuti, non che ricordare la natura e i caratteri delle stesse lesioni anatomo-patologiche da me descritte in questi pellagrosi, perfettamente analoghe a quelle osservate nei polli in discorso.

Non dovrà perciò far meraviglia se io qui mi sento autorizzato a concludere che i fenomeni acuti, seguiti spesso da morte nei polli nutriti con mais guasto, abbiano la stessa etiologia e la stessa patogenesi della pellagra acuta dell' uomo; determinata appunto, secondo le mie ricerche, nella massima parte dei casi, dalle proprietà patogene specifiche dell' *Aspergillus fumigatus*, e specialmente dalle sue spore, le quali, entrate in circolo per via gastro-enterica, si possono poi localizzare nei vari organi e tessuti.

Il secondo fatto poi emerso da queste ultime mie ricerche sui polli, che viene a confermare sempre più l' importanza degli Aspergilli nell' etiologia delle forme di pellagra acuta, risulterebbe dalla diminuita resistenza ai tossici aspergillari presentata in genere dagli animali già colpiti da intossicamento maidico cronico. A tale proposito mi basti ricordare la frequenza con cui il tifo pellagroso insorge in individui che di solito da tempo più o meno lungo già presentavano dei sintomi di pellagra cronica.

Questo processo morboso della pellagra acuta, tutto speciale e che non ha nessun riscontro nella patologia generale, per semplice analogia, mi permisi di ascriverlo ai processi infettivi; sebbene contro il concetto classico dell' infettività stabilito da Koch, stesse il fatto che il germe nell'organismo che lo alberga rimane sempre allo stato di vita latente, come è quello di spora, e quindi come non si riproduce, così non dovrebbe presentare alcuna proprietà metabolica.

Il meccanismo con cui si svolge tale processo morboso si scosta pur tanto dai comuni processi d'intossicazione, intesa nel senso che un veleno già preformato e allo stato libero venga introdotto nell' organismo, come sarebbe appunto il concetto di Lombroso per la etiologia della pellagra; ma è invece di tale natura che io credo giustificato se lo ascrissi al gruppo dei fenomeni d' infezione e non d' intossicazione. Trattasi infatti di germi patogeni che arrivati nel tubo gastro-enterico ne attraversano le pareti, entrano in circolo, si localizzano più facilmente in certi organi e tessuti che in altri, e che per mezzo dei loro tossici potentissimi, danno luogo a fenomeni di reazione locale (reazione leucocitaria, ecc.), non che a fenomeni di reazione generale (elevamento di temperatura, gravi disturbi psichici, forte aumento dell' eccitabilità neuro-muscolare, ecc.).

Aggiungasi poi che lo stesso insorgere e decorrere della malattia (tifo pellagroso) ha tutti i caratteri di un processo infettivo acuto e nessuno di quelli d' intossicazione. La malattia comincia infatti con un periodo prodromico abbastanza lungo che può durare da una a due settimane ed è caratterizzato da sintomi complessi, da malessere generale e da uno stato di grave confusione mentale, pel quale i malati sono inviati quasi sempre ai manicomî.

In tali condizioni rimane l' infermo per un periodo di tempo variabile di solito tra 8-10 giorni, fino a che scoppiano i gravi fenomeni acuti; per quanto da parecchi giorni sia già stata completamente sospesa l' alimentazione infetta a cui dobbiamo attribuire la malattia, e per quanto ancora, come risultò dalle mie ricerche in proposito, dal contenuto intestinale di questi infermi, sia in vita, che al tavolo anatomico, assai difficilmente sia possibile riscontrare la presenza dei parassiti vegetali, che sono già penetrati invece negli organi interni.

Ciò non ostante il Gosio [1] vorrebbe annoverare questo processo, infettivo-tossico tra i processi d'intossicazione comune; ma ciò credo non sia possibile per le ragioni sopra esposte.

Comunque, trattasi qui soltanto di questione di parole; mentre ciò che a me preme di affermare è il momento etiologico delle forme abbastanza frequenti di pellagra acuta, con un quadro clinico tipico, a decorso febbrile (nel quale la temperatura può salire a 40°-41°), e con esito quasi sempre letale e delle quali il Gosio parrebbe ignorare invece l'esistenza; almeno a giudicare da quanto egli scrisse nella sua memoria sulla genesi penicillare tossica della pellagra, nella quale egli appunto insiste nel dire che tale malattia non ha nulla di comune colla infezione, perchè è un processo cronico, apiretico, con mancanza di sintomi infiammatori, ecc. [2].

Ecco ora le conclusioni che mi credo autorizzato a trarre dai nuovi risultati delle ricerche brevemente qui sopra esposte:

1. I polli sottoposti alla nutrizione costante e prolungata di mais fortemente avariato presentano dei fenomeni tipici della pellagra cronica e acuta, i quali si esacerbano in modo particolare nella primavera e meno nell'estate e autunno e vanno poi scomparendo nelle stagioni fredde, non ostante che l'alimentazione suddetta rimanga invariata.

2. I polli possono resistere a lungo a questa alimentazione infetta (fino a 4 e più anni) e la loro morte può avvenire sia con fenomeni acuti caratteristici dalla pellagra acuta, sia con fenomeni cronici di cachessia.

Nei casi acuti, la morte è, se non sempre, di frequente in rapporto di causa con lesioni flogistiche acute degli organi interni (localizzate specialmente al polmone e al pericardio), le quali sono di natura aspergillare, e più precisamente determinate da spore aspergillari provenienti dall'intestino, ivi giunte per mezzo dell'alimentazione infetta.

1 Gosio. Lavoro citato. *Rivista pellagrologica ecc.*

2 Gosio. Ricerche batteriologiche e chimiche nelle alterazioni del mais. *Rivista d'Igiene e Sanità pubblica.* Anno VII. N. 21 e 22. 1896.

Nei casi di morte con fenomeni di marasma pellagroso, all' autopsia si possono riscontrare dei residui di processi flogistici pregressi (pericardite).

3. I polli nati da procreatori già da tempo sottoposti all'alimentazione di mais guasto non presentano veruna resistenza speciale a questa specie di alimentazione, ma si comportano verso questa come i polli nati da procreatori sani.

4. I polli nutriti a lungo con mais guasto e che presentano i sintomi caratteristici della pellagra cronica resistono assai meno all' azione patogena delle spore aspergillari, che i polli sani.

5. Le spore dell' *Aspergillus fumigatus*, inoculate nel pericardio dei polli anche in minima quantità, possono determinare la morte con fenomeni caratteristici della pellagra acuta o sub-acuta, pur rimanendo sempre allo stato di spore, le quali determinano una grave e tipica reazione locale e vengono distrutte solo da un processo extracellulare.

---

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA

*Fig. 1.* — Pericardite fibrinosa adesiva aspergillare con due focolai nodulari in pollo vissuto 46 giorni. Colorazione alla tionina e safranina. Ingrandimento 115 diametri.

*a.* — Fibre muscolari del miocardio.
*b - b'* Pericardio viscerale e parietale con tessuto granulare di proliferazione.
*c.* — Cellule giganti limitanti i focolai nodulari.
*d.* — Spore di *Aspergillus fumigatus.*

*Fig. 2.* — Pericardite fibrinosa adesiva del medesimo pollo. Colorazione alla tionina e safranina. — Ingrandimento di 500 diametri.

*a.* — Fibre muscolari del miocardio.
*b.* — Tessuto granulare da proliferazione del pericardio.
*c.* — Cellule giganti.
*d.* — Spore di *Aspergillus fumigatus* di aspetto normale.
*e.* — Id. in via di disgregazione.



Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

**PROF. A. TAMBURINI**

IN UNIONE AI PROF.RI

**C. GOLGI, E. MORSELLI, A. TAMASSIA, E. TANZI.**

COLLABORATORI

R. Adriani - C. Agostini - G. Algeri - C. Amadei - E. Belmondo - C. Bonfigli - R. Brugia - A. Cristiani - G. D'Abundo - G. Fano - C. Lombroso - L. Luciani - V. Marchi - G. Mingazzini - M. L. Patrizi - G. Peli - G. Pellizzi - G. Riva - L. Roncoroni - F. Sano - G. Seppilli - U. Stefani - R. Tambroni - L. Tenchini - S. Tonnini - N. Vaschide - G. Vassale - G. Virgilio.

REDATTORI

G. C. FERRARI - C. STERN

C. BERNARDINI - C. BESTA - C. CENI - A. DONAGGIO - E. FORNASARI
F. GIACCHI - G. GUICCIARDI - F. MARIMÒ - G. MODENA
G. PASTROVICH - P. PETRAZZANI - G. PIGHINI - P. PINI

Amministratore: Dott. C. TREBBI.

La **Rivista** si pubblica in **fascicoli trimestrali.**

## PREZZO DI ASSOCIAZIONE

Per l'Italia **L. 20** Per l'Estero **L. 24.**

Un fascicolo separato costa **L. 5,00.**

Le domande di associazione devonsi dirigere alla *REDAZIONE DELLA RIVISTA DI FRENIATRIA, PRESSO L'ISTITUTO PSICHIATRICO, S. MAURIZIO, REGGIO-EMILIA.*

S' intende continuata l'associazione per l'anno venturo, quando non è disdetta un mese innanzi alla fine dell'anno.

Di ogni pubblicazione scientifica interessante il giornale, di cui sia inviata copia alla Redazione, sarà dato annunzio nel bollettino bibliografico.

I reclami per fascicoli mancanti debbono esser fatti entro un trimestre.

La Rivista accorda in dono agli autori 50 copie dei loro scritti; per le copie in più si metterà a loro carico la sola spesa di tiratura e carta.

Ai Librai si accorda lo sconto del 10 per cento.

L'associazione nei paesi esteri, che hanno aderito all' accordo postale di Vienna del 1892, può esser fatta anche presso i rispettivi Uffici postali e in tal caso il prezzo annuo d'associazione è di **L. 20.**




# Abdruck

aus:

# „Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie“

herausgegeben von

Prof. Prof. Dr. Dr. Aschoff in Marburg, v. Baumgarten in Tübingen, Bendz in Lund, Bollinger in München, Bostroem in Gießen, Chiari in Prag, Eppinger in Graz, Ernst in Zürich, Foà in Turin, Golgi in Pavia, Griffini in Genua, Hauser in Erlangen, Homén in Helsingfors, Klebs in Hannover, Klemensiewicz in Graz, Löwit in Innsbruck, Lustig in Florenz, Marchand in Leipzig, Martinott, in Bologna, Nauwerck in Chemnitz, Neumann in Königsberg i. Pr., Paltauf in Wien, Pertik in Budapest, Podwyssozki in Odessa, Reddingius in Groningen, Ribbert in Marburg, Schottelius in Freiburg i. Br., Schmorl in Dresden, Spronck in Utrecht, Stilling in Lausanne, Stroebe in Hannover, Thoma in Magdeburg-Sudenburg, Tizzoni in Bologna, Weichselbaum in Wien, Ziegler in Freiburg i. B.

redigiert von

**Dr. E. Ziegler,**

Professor der patholog. Anatomie und der allgem. Pathologie in Freiburg i. Br.

**Siebenunddreißigster Band. 1904.**

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Als Supplementhefte zu den Beiträgen erschienen bisher:

Heft I.

## Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms.

Von Dr. **Giuseppe Pianese,** Assistent am Institut für path. Anatomie der Universität Neapel. Aus dem Italienischen übersetzt von Dr. med. R. Teuscher in Jena. Mit 8 lithogr. Tafeln. 1896. Preis: 24 Mark, für Abnehmer der „Beiträge“ 18 Mark.

Heft II.

## Die Vaccinekörperchen.

Nach Untersuchungen an der geimpften Hornhaut des Kaninchens. Ein experimenteller und kritischer Beitrag zur Frage nach dem Contagium der Vaccine. Von Dr. **Armand Hückel,** vormals Privatdocent an der Universität Tübingen. Mit 4 lithogr. Tafeln. 1898. Preis: 8 Mark, für Abnehmer der „Beiträge“ 6 Mark.

Heft III.

## Ueber die Bedeutung der Mischinfektion bei der Lungenschwindsucht.

Pathologisch-anatomische, bakteriologische und experimentelle Untersuchungen. Von Professor **A. Sata,** aus Osaka, Japan. Mit 2 Tafeln u. 14 Fig. im Text. 1899. Preis: 8 Mark, für Abnehmer der „Beiträge“ 6 Mark.

Heft IV.

## Der Echinococcus alveolaris sive multilocularis.

Histologische Untersuchungen. Von **N. Melnikow-Raswedenkow,** Privatdocent der K. Universität Moskau. Mit 6 Tafeln und 94 Textfiguren. 1901. Preis: 16 Mark, für Abnehmer der „Beiträge“: 12 Mark.

## Semiologie u. Differentialdiagnostik der verschiedenen Arten von Kurzatmigkeit auf Grund der Atemkurve.

Von Dr. **Ludwig Hofbauer,** z. Z. Assistent der III. med. Abteilung im Wiener allgemeinen Krankenhause. Mit 165 Kurven im Text. Preis: 8 Mark.

## Die Frühdiagnose des Abdominaltyphus.

Eine klinische u. literarische Studie von Dr. **A. Kühn,** Privatdozent a. d. Universität Rostock. Preis: 3 Mark 60 Pf.

## Statistische Vergleichstabellen zur praktischen Koprologie bei fieberlosen Patienten.

Für Mediziner und Nahrungsmittelchemiker von **Baron Dr. Oefele,** praktischem Arzte für Diabetes und andere Stoffwechselkrankheiten, zur Zeit in Bad Neuenahr. 1904. Preis: 4 Mark.

Zentralblatt f. Stoffwechsel- und Verdauungskrankheiten, Nr. 10, Mai 1904.

Sicherlich findet die Bearbeitung, welche neue Wege in gut fundierter Weise zeigt, viele Verehrer unter den Aerzten und Nahrungsmittelchemikern. Schilling (Leipzig).

## Herz- und Kreislaufstörungen.

Von Dr. **Th. Rumpf,** Professor e. o. an der Universität Bonn. (Vorträge aus dem Gebiete der allgemeinen Therapie. Erstes Heft.) 1904. Preis: 1 Mark.

## Grundriß der Lungenchirurgie.

Von **C. Garrè,** Professor der Chirurgie an der Universität Königsberg und **H. Quincke,** Professor der inneren Medizin an der Universität Kiel. Mit 30 zum Teil farbigen Abbildungen. 1903. Preis: 3 Mark.

## Morphologie und Biologie der Zelle.

Von Dr. **Alexander Gurwitsch,** Privatdozent der Anatomie in Bern. Mit 239 Abbildungen im Text. Preis: 9 Mark, geb. 10 Mark.

# XVII.

# Die pathogenen Eigenschaften des Aspergillus niger mit Bezug auf die Genese der Pellagra.

Von

**Dr. Carlo Ceni,** und **Dr. Carlo Besta,**
Dozent und Direktor der wissenschaftlichen Laboratorien. — Assistenzarzt.

Aus dem psychiatrischen Institut zu Reggio-Emilia.

---

Die pathogenen Eigenschaften von Aspergillus niger waren bisher noch nicht Gegenstand spezieller Untersuchungen.

Rénon gibt sogar zum Beweis, daß sie entweder sehr spärlich oder überhaupt gleich Null sind, die Tatsache an, daß die Leukocyten des Lymphsacks beim Frosche die Sporen des Aspergillus niger aktiv aufzunehmen vermögen, während sie jene des Aspergillus fumigatus zu umschließen unfähig sind.

Bei der großen Bedeutung, die neueren Untersuchungen zufolge die Aspergillen, vornehmlich der Aspergillus fumigatus, für die Ätiologie der Pellagra gewonnen haben, wollten wir auch die Eigenschaften des Aspergillus niger studieren, besonders von der Tatsache ausgehend, daß Ceni außer dem fumigatus und dem flavescens auch diesen Keim an der Leiche, an chronischer Pellagra gestorbener Individuen [1]) isoliert hat und daß, wie sich aus einer künftigen Veröffentlichung ergeben wird,

---

[1]) Die vorliegenden Versuche wurden im Sommer 1903 und im Winter 1903—1904 ausgeführt. Einige wurden ferner mit dem im Jahre 1901 aus einer Leiche isolierten Keim angestellt, während andere mit frisch, aus schlechten hygienischen Medien isolierten Keimen ausgeführt wurden. Schon hier bemerken wir, daß beide Keime keine merklichen Unterschiede aufwiesen, hinsichtlich der Entwicklung sowohl wie des pathogenen Verhaltens, was die große Widerstandfähigkeit dieses Parasiten beweist, der nach ungefähr 3 Jahren noch seine Eigenschaft, Toxine zu produzieren, unverändert beibehält.

dieser Keim unter schlechten hygienischen Verhältnissen und zu bestimmten Jahreszeiten bedeutend mehr verbreitet ist, als man bisher annahm.

Dabei haben wir uns vorgenommen, sowohl den Grad des pathogenen Vermögens, wie auch den Mechanismus seiner Entfaltung zu untersuchen und zwar in derselben Weise wie bei Aspergillus fumigatus und flavescens und bei den Penicillien, indem einerseits der Keim selbst zur Anwendung kam, andrerseits versucht wurde, eventuelle, spezifische, toxische Substanzen zu gewinnen.

Mit dem Keim wurden auf dreierlei Weise Versuche angestellt:

a) intraperitoneale Injektion von Sporenemulsionen,

b) intraperitoneale Inokulation von infizierten Maiskörnern,

c) Ernährung mit infiziertem Material (Mais oder Mehl).

Die Extrahierung der Toxine wurde mit Wasser (durch Kochen) und mit Alkohol (entweder siedend oder kalt) versucht.

Es wurde von uns der event. Gegenwart einer Phenolreaktion sowohl in den Nährmedien, wie in den Auszügen der Kulturen besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Immer haben wir die Reaktion geprüft sowohl unter Anwendung der Methode von Gosio, wie auch mit jener von di Pietro, um die Richtigkeit der Ansicht Gosio's festzustellen, welcher auch dem Aspergillus niger eine Bedeutung bei der Pathogenese der Pellagra zuschreibt, indem er annimmt, daß eine solche bloß durch die Phenolsubstanzen bedingt wird, welche als Stoffwechselprodukte dieses Pilzes in das Nährsubstrat diffundieren.

Hier nun das Ergebnis der Versuche.

## I. Versuche mit dem Keim.

### A. Intraperitoneale Injektion.

Es wurden Versuche an Meerschweinchen, Kaninchen und Hunden angestellt.

Emulsionen aus Maiskörnern gewonnen:

1. 10 Maiskörner, von dichter schwarzer Pilzvegetation bedeckt, werden in 15 ccm Wasser tüchtig geschüttelt: man erhält auf diese Weise eine dichte schwarze Emulsion.

I. Meerschweinchen von 420 g Gewicht — Injektion von 5 ccm (4 Körner). Nimmt bedeutend an Gewicht ab, da es nach 6 Tagen auf 380 g herunterkommt; dann nimmt das Gewicht wieder zu mit Tendenz zur Erholung. — Wird nach 15 Tagen getötet.

Sektion. — Breites Exsudat auf der Leber und der Milz; ein großer Knoten von schwärzlicher rahmartiger Substanz auf dem Mesenterium;

die Darmschlingen sind frei. In den Organen (Leber, Nieren, Milz) sind keine Knötchen.

Kulturergebnis. — Aus dem Peritonealexsudat: Übertragung in RAULIN'sche Flüssigkeit brachte keine Entwicklung des Keimes.

II. Meerschweinchen von 500 g Gewicht. Injektion von 10 ccm (6 Körner). — Stirbt unter progressivem Verfall nach 7 Tagen (wiegt dann 310 g).

Sektion. — Die Darmschlingen sind stark hyperämisch: im oberen Teil der Abdominalhöhle macht ein ausgedehntes Exsudat den Magen, die Leber und die Milz adhärent. Knötchen in den Organen fehlen.

Kulturergebnis. — Aus dem Peritonealexsudat: spärliche Entwicklung des Keimes aus der Leber und den Lungen: negativ.

2. 15 Körner von infiziertem Mais werden mit 30 ccm Wasser emulsioniert.

III. Meerschweinchen von 640 g Gewicht. Injektion von 10 ccm (5 Körner). — Stirbt unter den Erscheinungen einer progressiven Kachexie nach 10 Tagen.

Sektion. — Die Darmschlingen, die Leber, die Milz, die Nieren sind von einer dichten Schicht gallertiger Substanz umschlossen und adhärieren: die Leberkuppe ist mit dem Zwerchfell verwachsen; die Leber und die Milz sind überaus zerdrückbar. Die Lungen hyperämisch, die Pleuralhöhle enthält serös-blutige Flüssigkeit. Es werden keine nodulären Bildungen bemerkt.

Kulturergebnis. — Aus dem Peritonealexsudat, der Leber, der Milz: — positiv.

IV. Meerschweinchen von 570 g Gewicht. Injektion von 20 ccm (10 Körner). — Stirbt nach 16 Stunden unter Depressionserscheinungen.

Sektion. — Die Emulsion liegt in der Peritonealhöhle verteilt; diese enthält seröse Flüssigkeit: die Darmschlingen, die Leber und die Milz sind stark hyperämisch.

3. 15 Körner werden mit 30 ccm Wasser emulsioniert.

I. Kaninchen von 2085 g Gewicht. Es werden 10 ccm Emulsion injiziert. Nimmt an Gewicht während 6 Tagen (bis zu 1750 g Gewicht) ab, dann erholt es sich. Wird nach 15 Tagen getötet.

Sektion. — Keine Reste der Emulsion mehr: Die Organe zeigen normales Aussehen.

Kulturergebnis. — Aus dem Peritoneum, der Leber, der Milz: negativ.

II. Kaninchen von 2275 g Gewicht. — Injektion von 20 ccm. — Das Gewicht vermindert sich um mehr als 400 g binnen 7 Tagen, dann erholt sich das Tier. Wird nach 15 Tagen getötet.

Sektion. — Nichts Bemerkenswertes.

Kulturergebnis. — Negativ.

Emulsionen aus Pilzrasen gewonnen:

1. 10 qcm von sporenreicher Kultur werden mit 15 ccm destillierten Wassers emulsioniert.

I. Meerschweinchen von 470 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. — Stirbt an progressivem Verfall am 21. Tage.

Sektion. — Gallertiges Exsudat, welches die Organe der Abdominalhöhle umschließt; oberflächliche Knötchen auf der Blase, den Darmschlingen und den Nieren; weißliche Knötchen in der Leber. Lungen hyperämisch. — Einige Leberstücke wurden in Alkohol fixiert zur mikroskopischen Untersuchung. — Die Leberknötchen weisen eine der Pseudotuberkulose analoge Beschaffenheit auf, wie sie durch Aspergillus fumigatus verursacht wird. Man beobachtet nämlich einen großen Haufen Leukocyten, zwischen denen man die großen Sporen des Aspergillus niger wegen ihrer besonderen Lichtbrechung und ihrer bräunlichen Farbe leicht erkennt; viele dieser Sporen zeigen einen schwachen Seitenauswuchs, der einen Versuch von Vermehrung darstellt. Keine Phagocytoseerscheinungen; einige Sporen erscheinen hingegen in ihrer Beschaffenheit verändert und fragmentiert. — Das Lebergewebe zeigt sich schwärzlich, und man erkennt leicht, daß besonders an der Peripherie der Knötchen die Leberzellen in verschiedenen Stadien der Entartung begriffen sind; die Gefäße sind stark erweitert; bei einigen Knötchen ist ferner das Anfangsstadium einer Bindegewebsneubildung zu bemerken.

II. Meerschweinchen von 500 g Gewicht. — Injektion von 10 ccm. — Stirbt nach 48 Stunden.

Sektion. — Die Emulsion liegt in der Peritonealhöhle verteilt, welche eine große Menge seröser Flüssigkeit enthält. Die Darmschlingen, die Leber und die Milz sind stark hyperämisch und zeigen ein oberflächliches Exsudat von gallertigem Aussehen.

2. 10 ccm von sporenreicher Kultur werden mit 15 ccm Wasser emulsioniert; sie werden einem Kaninchen von 1900 g Gewicht injiziert. — Das Tier kommt 7 Tage hindurch herunter, dann erholt es sich. — Wird nach 20 Tagen getötet.

Sektion. — Die Organe sehen normal aus; im Peritoneum erkennt man hier und da Reste der Kultur, die von einer schwachen Schicht von Bindegewebe mit überaus spärlicher rahmartiger Substanz eingekapselt sind.

3. Drei Pilzrasen werden mit 60 ccm Wasser emulsioniert; das Mycelium wird vollkommen mittels Filtration durch ein feines Filter eliminiert; man erhält auf diese Weise eine ziemlich dichte Emulsion, die man für 1 Minute siedend kocht.

Hund von 6 kg Gewicht. — Injektion von 60 ccm. — Erscheinungen innerer Depression; der Leib ist schmerzhaft bei Palpation. Das Tier stirbt binnen 18 Stunden.

Sektion. — Kongestion der Peritonealhöhle und der Darmschlingen mit reichlichem Exsudat. — Innere Organe hyperämisch; die Lungen erscheinen asphyktisch.

Zusammenfassend sieht man also, daß die Emulsionen von Sporen des Aspergillus niger, sowohl bei Entwicklung des Keimes auf Maiskörner, wie bei jener in der RAULIN'schen Flüssigkeit, in die Peritonealhöhle eingeführt bedeutende pathologisch-anatomische Schädigungen, wie dies bei Aspergillus fumigatus und flavescens und bei den Penicillien der Fall ist, hervorrufen und zwar vor allem bei den Meerschweinchen.

Die klinischen Erscheinungen äußern sich vornehmlich in Kräfteverfall des geimpften Tieres (was auch bei den Kaninchen ganz deutlich hervortrat, die jedoch am Leben blieben), in Mattigkeit und Depression; Erregungserscheinungen von seiten des Nervenmuskelapparates fehlen dabei absolut.

Der Grad der Pathogenität des Aspergillus niger hat sich als ein bedeutend höherer erwiesen, als wie bei beiden Arten von Penicillium glaucum, für welche sich, wie unsere Versuche zeigen, das pathogene Vermögen bei den aus Körnern gewonnen Emulsionen gleich Null, und bei den aus Kulturen gewonnenen Emulsionen als außerordentlich gering ergeben hat; bei den letzteren muß man auf sehr viel größere Mengen (12—15 qcm Pilzrasen) ausstreichen, als bei jenen, die hier bei Meerschweinchen tödlich waren.

Das toxische Vermögen nähert sich jenem der beiden anderen obenerwähnten Aspergillusarten, doch ist es geringer, wie bei jenen, vor allem wie bei fumigatus.

### B. Intraperitoneale Inokulation von infizierten Maiskörnern.

Auch hier wurden die Versuche an Meerschweinchen und Kaninchen angestellt.

I. Meerschweinchen von 530 g Gewicht. Drei Körner werden in die Peritonealhöhle inokuliert. — Gewichtsabnahme während einiger Tage, dann erholt sich das Tier. Wird nach 37 Tagen getötet.

Sektion. — Organe von normalem Aussehen. Die Maiskörner sind von einer schwachen Schicht von Bindegewebssubstanz umschlossen.

II. Meerschweinchen von 505 g Gewicht. Sechs infizierte Maiskörner werden inokuliert. — Progressives Eingehen. Stirbt nach 6 Tagen.

Sektion. — Innere Organe stark hyperämisch. — In der Peritonealhöhle reichliches Exsudat. — Die Maiskörner sind in einem zwischen den Darmschlingen gelegenen Sack enthalten und von einem fibrinösen Exsudat umgeben.

III. Meerschweinchen von 410 g Gewicht. Sechs infizierte Maiskörner werden inokuliert. — Progressives Eingehen. Stirbt nach 18 Tagen mit einem Gewicht von 200 g.

Sektion. — In der Peritonealhöhle ist ein reichliches fibrinöses Exsudat vorhanden, welches die Darmschlingen untereinander adhärieren läßt; zwischen diesen, in einem Sack, liegen die Maiskörner. Die Leber, die Nieren, die Milz und die Lungen sind stark hyperämisch.

IV. Meerschweinchen von 520 g Gewicht. Acht infizierte Körner werden inokuliert. — Stirbt nach 28 Stunden.

Sektion. — Akute Peritonitis mit reichlichem serös blutigem Exsudat; die Organe sind stark hyperämisch.

V. Meerschweinchen von 450 g Gewicht. Es werden zehn Körner inokuliert. — Stirbt nach 32 Stunden.

Sektion. — Derselbe Befund wie der vorangehende.

I. Kaninchen von 2350 g Gewicht. Sechs infizierte Maiskörner werden in die Peritonealhöhle inokuliert. — Nimmt an Gewicht um 400 g binnen 7 Tagen ab, dann nimmt das Gewicht wieder zu. Wird nach 37 Tagen getötet.

Sektion. — Die Körner sind eingekapselt und von reichlicher Menge käsiger Substanz umschlossen, die eine Masse von der Größe eines Hühnereies bildet. Innere Organe von ganz normalem Aussehen.

II. Kaninchen von 2510 g Gewicht. Es werden zehn infizierte Maiskörner inokuliert. Stirbt nach 7 Tagen, allmählicher Verfall.

Sektion. — Die Körner sind in einem Sack, der trübe und mit käsigen Gerinnseln gemischte Flüssigkeit enthält, eingeschlossen. Der mit der Abdominalwand verwachsene Teil des Mesenteriums zeigt weißliche Knötchen; ähnliche Knötchen sind auf der Leberoberfläche vorhanden. Nieren und Milz normal; Lungen stark hyperämisch mit bronchopneumonischen Herden.

In allen Fällen wurde die kulturelle Untersuchung des Peritonealexsudates, welche immer positiv ausfiel, und jene der Organe (Leber, Niere, Lunge), welche immer negativ ausfiel, vorgenommen.

Die Krankheitserscheinungen bestanden immer in Erscheinungen von mehr oder weniger starker Depression, je nach der Menge des inokulierten Keimes; es wurden immer und in absoluter Weise Erscheinungen von Muskelnervenerregung vermißt.

Das pathologisch-anatomische Bild ist hingegen demjenigen sehr ähnlich, welches man durch Inokulation von Maiskörnern erhält, die mit Aspergillus fumigatus infiziert sind, besonders wenn der Aspergillusstamm geschwächt ist, da auch hier intensive Lokalreaktion mit serösem blutigem Exsudat auftritt; die Masse der käsigen Substanz ist hier jedoch immer bedeutend geringer, was auf eine geringe Leukocytenreaktion hindeutet.

Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um eine toxische Eigenschaft, die derjenigen analog ist, welche in den Sporen des Aspergillus fumigatus unabhängig vom krampferzeugenden Gift existiert — und die, wie einer von uns nachgewiesen hat, an die Sporen innig gebunden ist, während jene krampferzeugende bloß unter bestimmten biologischen Bedingungen des Keimes auftritt.

## Ernährung.

Die Versuche wurden sowohl mit infiziertem Mais, wie mit Mehl angestellt, dem man Pilzrasen beigemischt hatte.

a) Ernährung mit Mais.

Zur Verwendung kamen drei ausgewachsene Meerschweinchen von je 700—800 g Gewicht.

I. Meerschweinchen. Stirbt unter starkem Kräfteverfall nach 6 Tagen.

Sektion. — Darmschlingen stark hyperämisch; spärliche Flüssigkeitsmenge in der Peritonealhöhle. Die Lungen sind ebenfalls blutreich mit stellenweiser Hepatisation. Die übrigen Organe zeigen keine bemerkenswerten Erscheinungen.

Kulturergebnis. — Negativ für alle Organe.

II. Meerschweinchen. Wird nach 9 Tagen nahe dem Tode getötet. Ist stark heruntergekommen.

Sektion. — Derselbe Befund wie beim vorangehenden.

Kulturergebnis. — Negativ für alle Organe.

III. Meerschweinchen. Stirbt nach 11 Tagen.

Sektion. — Derselbe Befund wie oben.

Kulturergebnis. — Negativ für alle Organe.

b) Ernährung mit Mehl, dem Kulturhäute von Aspergillus niger beigemischt wurden (für jede 500 g Mehl die ausgetrocknete Pilzhaut einer Tyndall'schen Kultur).

Die Versuche wurden angestellt mit zwei ausgewachsenen Meerschweinchen von je ca. 700 g Gewicht.

I. Meerschweinchen. Stirbt nach 7 Tagen.

Sektion. — Innere Kongestion der Darmschlingen (?).

Kulturergebnis. — Negativ für alle Organe.

II. Meerschweinchen. Wird nach 7 Tagen getötet, nachdem es sehr abgefallen ist.

Sektion. — Derselbe Befund wie oben.

Kulturergebnis. — Negativ für alle Organe.

Eine erhebliche Toxizität des Aspergillus niger ergibt sich also auch aus diesen Versuchen; derselbe verhält sich bei seinem Eindringen in den Tierkörper auf dem Magendarmwege analog wie die beiden

anderen Aspergillusvarietäten und wie die Penicillien; dabei ist allerdings seine Giftigkeit eher etwas größer, insofern als bei den anderen obengenannten Arten die toxischen Eigenschaften der Kulturen gewöhnlich etwas geringer sind als die des infizierten Maises, bei ihm dagegen sich für beide Fälle die gleichen Resultate ergeben haben. Was wohl zu betonen ist, ist das absolute Fehlen von Erscheinungen neuromuskulärer Erregung; es trat ein rascher Kräfteverfall mit leichten Depressionserscheinungen auf, ohne weitere bemerkenswerte Symptome.

## II. Toxische Extrakte.

Wie bei Aspergillus fumigatus und flavescens und bei den Penicillien, haben wir auch hier versucht, die spezifischen Toxine sowohl mit Wasser (durch langdauerndes Kochen der Kulturrasen in demselben), wie mit Alkohol (entweder durch Kochen oder durch kalte Extraktion) zu gewinnen.

Gleich hier soll bemerkt werden, daß wir auf eine lange Reihe von Mißerfolgen gestoßen sind, welche durch die allzu geringe Menge des von uns zu Beginn angewendeten Materials bedingt waren; die Wasser- und die Alkoholextrakte aus zwei Rasen, Hunden von 6—10 kg Körpergewicht injiziert, riefen wohl Erscheinungen mehr oder minder ausgesprochener Depression hervor, doch verursachten sie nie den Tod der Tiere.

Man mußte viel größere Mengen von vier und mehr Kulturen nehmen, um konstante und deutliche Ergebnisse zu erzielen. Die Wasser- und die Alkoholextrakte, durch Kochen gewonnen (die kalte Extraktion gibt keinen Erfolg), besitzen beinahe die gleiche Wirksamkeit und dieselben spezifischen Eigenschaften. Deshalb berichten wir hier nur über drei Versuche.

1. Wasserextrakt. — Sechs Kulturrasen werden in 800 ccm destilliertem Wasser während 45 Minuten gekocht; der Wasserrückstand wird durch eine doppelte Schicht Fließpapier durchfiltriert (die Filtrierung vollzieht sich sehr langsam) und durch Verdampfung auf das Volumen von 60 ccm eingedichtet.

a) Hund von 11 kg Gewicht. Es werden 35 ccm ($3^1/_2$ Rasen) in die Peritonealhöhle injiziert. — Zeigt schwere Depressionserscheinungen; bleibt auf dem Boden liegen und sucht den Bauch, der überaus schmerzhaft ist, durch Andrücken ruhig zu stellen; palpiert man das Abdomen mit ganz leichtem Druck, so schreit der Hund laut.

Die Schmerzhaftigkeit des Abdomens dauert bloß 24 Stunden lang und nimmt dann ab; hingegen bleibt die starke Mattigkeit bestehen, welche erst am 3. Tage zur Abnahme neigt. Der Hund erholt sich sehr langsam.

b) I. Meerschweinchen von 600 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. — Stirbt nach 12 Stunden mit Erscheinungen intensiver und progressiver Depression.

Sektion. — Erhebliche Kongestion der Peritonealhöhle und der Darmschlingen mit reichlichem serösen blutigen Exsudat. Lungen hyperämisch mit Subpleuralblutungen und serösem Exsudat in den Pleuralhöhlen.

II. Meerschweinchen von 650 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. — Stirbt binnen 15 Stunden unter denselben Erscheinungen.

Sektion. — Derselbe Befund wie der vorangehende.

III. Meerschweinchen von 500 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. — Stirbt binnen 26 Stunden unter schweren Depressionserscheinungen.

Sektion. — Befund dem vorangehenden ähnlich; etwas weniger intensive Kongestion der Darmschlingen.

2. Alkoholextrakte.

1. Vier Pilzrasen werden in Alkohol gekocht, der Destillationsrückstand mit 40 ccm Wasser wieder aufgenommen.

Hund von 8 kg Gewicht. Injektion von 40 ccm. — Erscheinungen von schwerer Depression, das Tier geht mühsam und läßt den Kopf hängen; der Bauch ist sehr schmerzhaft; die Palpation desselben bringt das Tier zum Schreien. Stirbt binnen 18 Stunden.

Sektion. — Starke Kongestion des Peritoneums und der Darmschlingen mit reichlichem serösen blutigen Exsudat; Lunge und Leber gleichfalls hyperämisch.

2. Drei Kulturrasen werden in Alkohol gekocht; der Rückstand wird mit 30 ccm Wasser wieder aufgenommen.

I. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 15 ccm. — Stirbt nach 10 Stunden unter Erscheinungen progressiver Mattigkeit.

Sektion. — Sehr erhebliche Kongestion der Abdominalhöhle mit serösem, blutigem Exsudat. Starke Kongestion der inneren Organe.

II. Meerschweinchen von 500 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. — Stirbt nach 12 Stunden unter progressiver Depression.

Sektion. — Derselbe Befund wie der vorangehende.

III. Meerschweinchen von 650 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. — Starke und progressive Depression. Stirbt binnen 36 Stunden.

Sektion. — Kongestion der Darmschlingen mit serösem, schwach blutigem Exsudat.

Die Pilzrasen von Aspergillus niger enthalten also eine toxische Substanz von hervorragend depressiver Wirkung. Sie sind darin jener Varietät des Penicillium glaucum mit deprimierenden Toxinen sehr ähnlich; die Ähnlichkeit ergibt sich sowohl aus den Krankheitserscheinungen, wie aus dem pathologisch-anatomischen Befund; denn es gibt für diese Keime einerseits Erscheinungen von Depression und Schmerz-

haftigkeit des Abdomens, andrerseits erhebliche Kongestion und reichliches seröses blutiges Exsudat.

Ein deutlicher Unterschied besteht jedoch zwischen den Aspergillus- und den Penicilliumtoxinen darin, daß das Penicilliumtoxin durch Kochen mit destilliertem Wasser nicht ausziehbar ist (wir haben dabei in der Tat immer negativen Erfolg gehabt), weil dasselbe ganz wenig wasserlöslich ist. Im Zusammenhang damit steht sehr wahrscheinlich auch die Tatsache, daß die toxische Substanz des Aspergillus niger auch in die Kulturmedien diffundiert; wird nämlich die Kulturflüssigkeit auf eine kleine Menge reduziert, nachdem drei oder vier Rasen darauf gewachsen sind, und wird diese Flüssigkeit dann einem Hunde injiziert, so treten deutlich dieselben Krankheitserscheinungen auf, wie sie die Toxine der Rasen hervorrufen, und mitunter erfolgt auch der Tod des injizierten Tieres.

Diese Erscheinungen wurden, wenigstens bisher, niemals mit der Kulturflüssigkeit der Penicillien von deprimierender Wirkung und des Aspergillus fumigatus erzielt.

Ferner haben wir auf die Phenolreaktion speziell die Aufmerksamkeit gelenkt, da, wie wir schon gesagt haben, Gosio den Phenolverbindungen, von denen nach diesem Autor Aspergillus niger ein tätiger Erzeuger sein soll, das pathogene Vermögen zugeschrieben hat.

Die Tatsache, daß das Krankheitsbild, das Tiere bieten, die entweder mit Extrakten oder mit Kulturflüssigkeit, auf der sich der Keim entwickelt hat, vergiftet wurden, verschieden und gerade jenem entgegengesetzt ist, welches nach Gosio die Phenolverbindungen erzeugen würden, beweist schon, daß diese an dem von uns beobachteten Erscheinungskomplex keinen Anteil nehmen.

Jedenfalls haben wir Untersuchungen angestellt sowohl mit Gosio's Methode, wie mit der von di Pietro angegebenen, und haben die Kulturflüssigkeit und die Rasenauszüge parallel geprüft unter Anwendung sehr großer Materialmengen (z. B. des Auszuges von vier Rasen und deren eingedickter Kulturflüssigkeit). Bei keinem Falle konnten wir irgend eine Andeutung von Phenolreaktion feststellen; das Verhalten ist hier mit jenem der Penicillien von depressivem Vermögen und der übrigen Aspergillen ganz übereinstimmend gewesen.

Schließlich sei bemerkt, daß wir bei unseren Untersuchungen die Jahreszeiten in Betracht gezogen haben; denn wir kennen die große Bedeutung, welche sie bei der Erzeugung der toxischen Substanzen der Penicillien und der Aspergillen besitzen. Hinsichtlich des Aspergillus niger konnten wir keine große Verschiedenheit nachweisen, es schien uns jedoch, daß die in der warmen Jahreszeit bei Zimmertemperatur gezüchteten Pilzrasen mit größerer Toxizität ausgestattet waren, als jene in der kalten Jahreszeit ebenfalls bei Zimmertemperatur gezüchteten. Dies könnte aber mit der geringeren Entwicklung, welche in dieser Zeit

der Pilz aufweist, in Zusammenhang stehen. Zu einer diesbezüglichen sicheren Beantwortung sind auch hier weitere Untersuchungen notwendig.

Fassen wir die Resultate unserer Untersuchungen nun zusammen, so ergibt sich, daß der Aspergillus niger pathogen ist, da er durch Wasser sowohl wie durch Alkohol ausziehbare toxische Substanzen zu bilden vermag, die identische Erscheinungen hervorrufen, wie jene, welche von den Parasiten in toto hervorgerufen werden.

Wir bemerken und wir betonen es, daß der Charakter dieser toxischen Substanzen im Gegensatz zu jenem steht, welchen die ausziehbaren Toxine des Aspergillus fumigatus und, im geringeren Maße, des flavescens äußern; während durch diese Toxine Erscheinungen von Nervmuskelerregung mit Stößen, Zittern, tetanusähnlichen Anfällen, Krämpfen etc. ausgelöst werden, verursachen die toxischen Substanzen des Aspergillus niger anstatt dessen Erscheinungen von allgemeiner Depression und Mattigkeit mit erheblicher Schmerzhaftigkeit des Abdomens, ähnlich wie es einige Penicilliumarten tun.

Das Symptomenbild der Erscheinungen beweist schließlich, daß diese Toxine in gar keiner Beziehung zu den Phenolverbindungen stehen, die wir übrigens niemals, weder in den Kulturflüssigkeiten noch in den Toxinauszügen haben nachweisen können.

Diese hervorragende Verschiedenheit in der Wirkung der ausziehbaren Toxine des Aspergillus fumigatus und des flavescens einerseits, und des Aspergillus niger andrerseits beweist, daß sich die Aspergillen wie die Penicillien in bezug auf ihr pathogenes Vermögen sehr wahrscheinlich in zwei große Gruppen: von krampferzeugendem Charakter die eine, von deprimierendem Charakter die andere, teilen.

Es ist überflüssig, hier weiter die Bedeutung hervorzuheben, die dieser Tatsache bei der Ätiologie der verschiedenen klinischen Pellagraformen dadurch zukommt. Es ist die Annahme logischerweise gerechtfertigt, daß der Aspergillus niger, ähnlich wie die deprimierende Gruppe der Penicillien, eine vorwiegende Rolle bei den chronischen Formen spielt; über diesen Gegenstand aber wollen wir uns hier nicht weiter auslassen.

## Schlüsse.

1. Der Aspergillus niger ist pathogen; die von ihm gebildeten toxischen Substanzen haben eine Wirkung von deprimierendem Charakter.

2. Die pathogenen Eigenschaften äußern sich unter identischen Erscheinungen, sowohl bei Anwendung des Pilzes in toto (Injektion oder Ernährung), als bei Anwendung der toxischen Substanzen.

3. Die toxischen Substanzen sind sowohl durch Wasser wie durch Alkohol ausziehbar und diffundieren in die Kulturflüssigkeiten.

4. Das pathogene Vermögen steht in keinem Zusammenhang mit Phenolverbindungen.

5. Der Aspergillus niger spielt wahrscheinlich wegen der Natur seiner toxischen Substanzen bei der Genese der chronischen Pellagraformen eine Rolle.

---

## Literaturverzeichnis.


Ceni, Gli Aspergilli nell' etiologia e patogenesi della pellagra, Rivista sperimentale di Freniatria fasc. 2 1902.

Ceni u. Besta, Über die Toxine von Aspergillus fumigatus und flavescens, und deren Beziehungen zur Pellagra, Centralbl. f. allg. Path. und path. Anat. 1902. — Siehe auch Riv. sper. d. Freniatria Vol. 28 1902.

Ceni, Sulle proprietà patogene del Penicillium glaucum nell' etiologia della Pellagra, Riv. sper. di Freniatria Vol. 29 1903.

Ceni e Besta, I Penicilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra, Ebenda 1903.

Ceni, Le proprietà tossiche dell' Aspergillus fumigatus in rapporto colle stagioni dell' anno, Ziegler's Beiträge zur path. Anat. u. allg. Path. 1904. — Siehe auch Riv. sper. di Freniatria Vol. 30 1904.

—, Nuove ricerche nella pellagra nei polli, Ebenda Vol. 30 1904.

—, Le proprietà tossiche di alcuni i fomiceti (Aspergilli e Penicilli) in rapporto colle stagioni dell' anno, Mitteilung zum XII. Kongreß der Società Freniatria Italiana zu Genua Oktober 1904. — Siehe Riforma medica 1904 und Rivista pellagrologica italiana 1904.

Rénon, Étude sur l'Aspergillose chez les animaux et chez l'homme, Masson, Paris 1897.

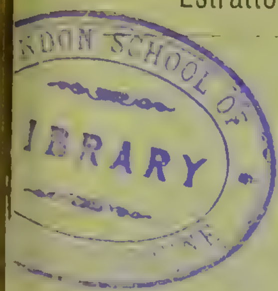
Gosio e Ferrati, Sull' azione fisiologica dei veleni del mais invaso da alcuni fomiceti, Riv. sperim. d' Igiene pubblica Anno 7 1896.

Gosio, Per l' etiologia della pellagra, Riv. pellagrologica ital. No. 3 1903.


---



Lippert & Co. (C. Pätz'sche Buchdruckerei), Naumburg a. S.




Estratto dagli ANNALI DI NEVROLOGIA - Anno XXIII, Fasc. III.

# RICERCHE SPERIMENTALI

SULLA

# LOCALIZZAZIONE ANATOMICA

## DEI SINTOMI DI DELIRIO DA TOSSICI PELLAGROGENI

NOTA PREVENTIVA

DEL

Dottor CARLO CENI
Medico Direttore dei Laboratorj scientifici



NAPOLI
R. TIPOGRAFIA FRANCESCO GIANNINI & FIGLI
Strada Cisterna dell'Olio
1905

ISTITUTO PSICHIATRICO DI REGGIO EMILIA

# RICERCHE SPERIMENTALI
SULLA
# LOCALIZZAZIONE ANATOMICA
## DEI SINTOMI DI DELIRIO DA TOSSICI PELLAGROGENI

NOTA PREVENTIVA

DEL
Dottor CARLO CENI
Medico Direttore dei Laboratorj scientifici

Voglio qui riferire i risultati di alcune mie esperienze sulla localizzazione anatomica dei sintomi del delirio tossico nei cani, basate sulla proprietà che hanno i tossici pellagrogeni, e precisamente sulla proprietà specifica che hanno i tossici di natura eccitante e convulsivante elaborati da alcune specie di Aspergilli e Penicilli e che costituiscono, secondo noi, dal punto di vista patogeno, un gruppo ben definito e distinto dall'altro gruppo pure di Aspergilli e Penicilli, che elaborano invece dei tossici di natura paralizzante e deprimente.

I fenomeni di eccitamento psichico, di delirio che si possono osservare nei cani in seguito all' iniezione dei tossici pellagrogeni del primo gruppo, sono tipici e di solito assai più intensi di quelli che si possono osservare con qualsiasi altro tossico, compreso l'absenzio, al quale già autori diversi ricorsero per questi studj sperimentali. Sono fenomeni che sorgono in media 20-30 minuti dopo l' iniezione peritoneale del tossico e che durano di solito da una a due ore circa, e anche più. Essi sono caratteristici della prima fase del quadro morboso presentato dagli animali sotto l' azione di questi tossici e insorgono contemporaneamente, si può dire, ai fenomeni di eccitamento muscolare, caratterizzati questi ultimi specialmente da un tremore intenso e continuo di tutte le parti del corpo e da uno stato convulsivo tutto speciale. I fenomeni psichici però non

sono mai continui come i motorj, ma si susseguono a veri accessi intercalati assai di frequente da accessi tetaniformi. Essi sono più o meno intensi e tipici a seconda dell' intensità del tossico usato, la quale varia di grado appunto, come già altrove dimostrai, a seconda della specie o varietà del parassita vegetale che ha elaborato il tossico e a seconda ancora della stagione in cui questo tossico fu elaborato. I tossici da Asp. fumigatus ed elaborati nella primavera, sono di solito quelli che danno dei fenomeni di eccitamento psichico più grave.

Gli animali, colla bava alla bocca e cogli occhi sbarrati, abbajano, guaiscono, emettono degli ululati spesso strozzati in gola da contratture spasmodiche della laringe e da un trisma intenso, e, come sotto l' impressione d' un forte spavento, cercano di fuggire, fanno dei movimenti di difesa e tentano di mordere. Questo eccitamento psichico è di solito troncato da un intenso accesso tetaniforme, ma qualche volta può continuarsi anche sotto l' accesso motorio, specialmente quando questo non è molto grave. L' esaurimento dei centri psico-sensoriali però precede sempre quello dei centri motori; di modo che, passata la prima fase dell' intossicamento specifico, che di solito dura, ripeto, da 2-5 ore, i fenomeni psichici vànno gradatamente diminuendo d' intensità fino a scomparire, e l' animale non presenta in seguito che fenomeni motori, come dissi, tremori, convulsioni e accessi tetaniformi.

È ora dei suddetti fenomeni di delirio tossico nel cane i quali devono certo avere il loro perfetto riscontro negli stati deliranti, nelle allucinazioni che si osservano nei pellagrosi, sotto l' azione degli stessi tossici da me qui sperimentati, come pure in tutti quei casi di delirio nell' uomo che sono in rapporto con uno stato d' intossicazione di natura esogena od endogena (alcoolismo, uremia, epilessia ecc.), che io ho voluto approfittare per lo studio della sede anatomica del delirio stesso.

In base al concetto formulato dal prof. Tamburini sulla patogenesi delle allucinazioni e oramai accettato da tutti perchè in perfetta armonia coi dati più classici di anatomia e fisiologia cerebrale, secondo il quale questo fenomeno psico-patologico consiste in uno stato irritativo dei centri psico-sensoriali, le mie ricerche furono eseguite senz'altro sui cani assoggettati all'azione dei tossici suddetti e sui quali prima o contemporaneamente determinavo una lesione del substratum anatomico dei fenomeni psico-sensoriali, vale a dire della corteccia cerebrale.

A tali ricerche fui poi indotto dal risultato di alcune altre mie esperienze preliminari fatte per precisare i caratteri di questi tossici pellagrogeni in rapporto colla loro azione sui centri nervosi; essendo da queste risultato in modo evidente che tutti i sintomi neuro-muscolari, il quadro completo della pellagra acuta, debbono considerarsi esclusivamente dovuti ad un'azione irritativa ed eccitante sui centri corticali esercitata dai suddetti tossici. Se a un animale in preda ai fenomeni classici di intossicamento da veleni pellagrogeni di natura eccitante e convulsivante si taglia, infatti, trasversalmente il midollo spinale, il tremore, lo stato convulsivo ecc., si troncano e per sempre negli arti e nella parte del tronco al di sotto del taglio; ma questi fenomeni neuromuscolari continuano nella parte al disopra del taglio.

L' azione eminentemente corticale di questi tossici fu dimostrata ancora da esperienze eseguite nei cani, i quali prima o durante i fenomeni d' intossicamento specifico venivano operati di ablazione in tutto del mantello cerebrale; in seguito alla quale operazione ogni sintomo psico-motorio e psico-sensoriale caratteristici del quadro morboso, erano prevenuti o sospesi completamente. L'animale rimaneva silenzioso e immobile, come intontito e nessun gruppo di muscoli sia quelli degli arti e del tronco, sia quelli della nuca e del muso, non presentavano più alcuna contrazione benchè minima. Non solo i centri del midollo non sono quindi in alcun modo influenzati da questi tossici pellagrogeni, ma neppure i centri del bulbo e della base del cervello.

In seguito all'ablazione della corteccia *in toto* si viene a prevenire o a sospendere come d'incanto perfino lo stato di respiro affannoso e ansante e quegli accessi di tachicardia che sono pure tipici del quadro morboso in discorso; per cui noi dovremo ritenere che anche questi ultimi siano fenomeni indiretti ed unicamente dovuti all'irritazione corticale; giacchè i tossici pellagrogeni non avrebbero alcuna azione diretta neppure sui centri del respiro nè su quelli del cuore.

Ciò premesso, ecco in breve il risultato delle mie esperienze, rivolte ora a studiare la sede anatomica del delirio nel cane e più precisamente rivolte a stabilire, almeno in modo approssimativo, quale è la parte che hanno le singole zone corticali nella produzione di questi fenomeni psico-sensoriali, pei quali la possibilità d'una sede sub-corticale, d' una sede nei talami ottici, secondo la teoria di Todd, Carpenter, Luys, Ball, Ritti, Fournié, ecc. era

stata già esclusa nel modo più assoluto dai risultati delle suesposte mie ricerche preliminari, coll'ablazione, cioè, *in toto* della corteccia cerebrale.

Lo studio della localizzazione corticale del delirio si basa per ora su esperienze eseguite sopra 5 cani, ai quali prima e durante la comparsa dei fenomeni classici d' intossicamento si distrussero col termo-cauterio anzi tutto una determinata zona corticale e precisamente i lobi frontali o quelli occipitali, e in seguito, dopo d'aver studiato gli effetti di questa prima lesione si distrussero altre zone, vale a dire i giri sigmoidei, oppure i lobi occipitali o frontali che prima avevo lasciato intatti.

Riassumo qui brevemente i risultati di queste esperienze, riserbandomi di diffondermi più a lungo su esse in un mio prossimo lavoro completo.

In seguito alla lesione dei lobi frontali d'ambo i lati, il quadro morboso si modifica assai poco sotto ogni rapporto. I fenomeni a carico dei centri motori continuano quasi invariati, come pressochè invariato si mantiene lo stato di eccitamento psichico e delirante dell'animale. I fenomeni variano invece notevolmente se la lesione viene estesa anche ai due giri sigmoidei. In tal caso scompajono i tremori intensi e diffusi, scompaiono le convulsioni e gli accessi tetaniformi, e solo qua e là si notano delle contratture fibrillari nelle diverse parti del corpo. L'animale non fa però alcun movimento nè per difendersi o altro; guaisce e abbaja assai meno di prima; ha gli occhi spalancati come sotto l'impressione d'uno spavento, ma il respiro è assai meno affannoso di prima, e quasi scomparsa è la tachicardia.

In seguito alla lesione diffusa dei lobi occipitali i fenomeni che sono a carico dei centri motori rimangono sempre tipici e inalterati, mentre lo stato di eccitamento psichico e lo stato delirante sembrano alquanto meno intensi che nel cane non operato. L'animale emette solo dei guaiti a bassa voce e come di lamento; esso eseguisce ancora movimenti di difesa e tenta di mordere, ma nei suoi atti presenta una lentezza così esagerata e una indeterminatezza così marcata da assumere un insieme di aspetto comico e compassionevole. Rivolgendosi verso un lato apre la bocca lentamente e mostra i denti; rimane così qualche secondo come intontito e poi la richiude di nuovo lentamente. I suoi occhi non hanno alcuna speciale espressione.

Se poi insieme ai lobi occipitali vengono lesi i centri motori, si troncano non solo tutti i fenomeni motorii, ma in gran parte anche i fenomeni psico-sensoriali in modo assai più netto che colla lesione dei lobi frontali e dei centri motorii. L'animale non emette che qualche flebile guaito e quasi senza aprir bocca, si lamenta, ma non fa più alcun movimento di difesa e non cerca di mordere e anche stimolato. Il respiro da affannoso diventa profondo e lento e il polso cardiaco debole, ma regolare.

Queste esperienze furono ripetute due volte e sempre cogli stessi risultati.

In seguito alla lesione contemporanea dei lobi occipitali e frontali, lasciando intatte le zone motrici, i risultati furono a un di presso identici a quelli che ottenni ledendo isolatamente i lobi occipitali. Si tratta però in questo caso di una sola esperienza, e mi riservo perciò di ritornare su questa parte nel lavoro completo coll'aiuto di altre esperienze. Intanto da quanto ho qui esposto risulta evidente:

1. I tossici pellagrogeni di natura eccitante e convulsivante (aspergillari e penicillari) presentano una marcatissima azione elettiva sui centri corticali; mentre non hanno alcuna azione funzionale nè sui centri del midollo spinale nè su quelli del bulbo, nè su quelli della base del cervello.

2. Questi tossici agiscono irritando ed eccitando tutti i centri corticali in modo diffuso, sia psico-motori, sia psico-sensoriali, senza mostrare alcuna speciale elettività per l'uno o per l'altro centro.

3. Il delirio avrebbe nel cane la sua sede anatomica in tutto il mantello cerebrale, ma prevalentemente nei lobi occipitali. Una sede subcorticale sarebbe esclusa in modo assoluto dai risultati di queste ricerche.

4. I fenomeni motori apparirebbero localizzati alla zona motrice nel senso ristretto della parola.

---

*Estratto dagli **Annali di Nevrologia*** — Anno XXIII, Fasc. III.



RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

Direttore: A. TAMBURINI

VOL. XXXI. FASC. II.



*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# POTERE PATOGENO dell' *Aspergillus Ochraceus*

## E SUO RAPPORTO COLL' ETIOLOGIA E PATOGENESI DELLA PELLAGRA

del Dott. CARLO CENI

DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO-EMILIA

TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO

1905.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXI. FASC. II.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# POTERE PATOGENO
# dell' *Aspergillus Ochraceus*
## E SUO RAPPORTO
## COLL' ETIOLOGIA E PATOGENESI DELLA PELLAGRA

del Dott. CARLO CENI
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1905.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

[616. 01]

L' ifomiceto che forma l' oggetto delle attuali ricerche, pel suo colore tipico e per la sua morfologia corrisponde alla varietà di aspergilli designata dai botanici col nome di *Aspergillus Ochraceus* (Wilhelm[1], Winter[2], Saccardo[3], Schroeter[4], Wehmer[5]); siccome però può esser facilmente confuso con altre varietà analoghe della svariata specie degli Aspergilli Gialli, e presenta inoltre delle notevoli diversità nei particolari morfologici dello stesso *Asperg. Ochraceus* descritto dagli altri autori; così credo opportuno riassumere qui anzitutto brevemente i principali caratteri da me riscontrati.

Il nostro Aspergillo, in condizioni opportune, vegeta abbastanza rapidamente dando prima una patina di color bianco-niveo; la quale in seguito, sporificando, dà luogo a un feltro di aspetto lanuginoso, assai folto, dello spessore di circa 6-8 mm. e di un color tipico giallo-bruno (giallo d' ocra), uniforme su tutta la superficie. Questo colore si mantiene quasi invariato anche nelle colture vecchie; solo dopo qualche mese diviene più chiaro, più sbiadito.

[1] Wilhelm K. Beiträge zur Kenntnis der Pilzgattung Aspergillus. *Strassburger Inaug. Dissert.* Berlin 1877.

[2] Winter. Perisporieen. Rabenhorst, Kryptogamenflora Deutschld. u. d. Schweiz 2 *Aufl.* B. I. Pilze. 2 *Abt.* Leipzig 1887.

[3] Saccardo. Sylloge fungorum ecc. B. X. *Suppl* 2. B. XI. *Suppl.* 3. Patavii 1886-1895.

[4] Schroeter. Aspergillaceen. Bd. III. Pilze. Breslau 1893.

[5] Wehmer. Die Pilzgattung Aspergillus in morphologischer, physiologisch. und systematischer Beziehung ecc. Genève 1901.

Cresce assai bene sul pane bianco, sulla polenta, sulle cariossidi di mais anche poco umidi; come pure cresce bene sui piselli e sulle castagne, ecc. Sul liquido Raulin poi vegeta più rigoglioso del solito, dando un feltro assai fitto e un' abbondante sporificazione. La superficie inferiore della patina, dopo la sporificazione del germe, dal color bianco passa gradatamente a quello di feccia di vino; colore che nelle colture vecchie si diffonde in parte anche al mezzo nutritivo.

Al disotto di 15° e al disopra di 30° non si sviluppa. Il suo *optimum* di temperatura è tra i 20 e i 25°, raggiungendo in queste condizioni il suo massimo sviluppo nel periodo di 8-10 giorni circa. Non furono riscontrati periteci. Questo fungo è quasi inodoro e fonde rapidamente la gelatina.

L' apparecchio conidifero è molto grosso (visibile a occhio nudo) e gli steli sono assai lunghi (2-3 mm.), robusti (10-12 μ. di larghezza), a pareti spesse e ricoperte alla superficie esterna da numerose escrescenze puntiformi; il rigonfiamento terminale dello stelo, generalmente sferico, può assumere anche una forma lievemente ovoidale, e ha un diametro da 25-40 μ. circa. Gli sterigmi sono assai lunghi, superando spesso il doppio del diametro della testa, (25-50 μ.), sono grossi, e terminano a clava; questi ora sono semplici, ma più spesso sono ramificati. Un sterigma primario si divide in 2-4 e più sterigmi secondari; questi ultimi sono di solito assai corti, misurando circa 7-8 μ. di lunghezza e 3-4 μ. di larghezza. Le spore sono grosse (4-5 μ.), disposte a lunghe catene e sono di solito lievemente ovoidali, più di raro sferiche.

Lo stelo, tutto l' apparecchio sporangico e le spore sono colorati in giallo-bruno e danno così il colore tipico del feltro.

L' *Aspergillus Ochraceus* è tra le varietà di Aspergilli meno diffuse in natura e meno conosciute in botanica. Su oltre 50 ambienti di pellagrosi ch' io esaminai anche ripetutamente, durante il 1904, una volta sola mi fu dato di riscontrare questo parassita in quantità degna di nota, e questo fu appunto nell' occasione d'una gita sull' Appennino della Provincia di Reggio-Emilia, fatta nella scorsa estate, allo scopo di compiere i miei studî sui rapporti tra l' endemia pellagrosa e le condizioni igieniche delle abitazioni della parte montagnosa di questa provincia, come riferirò a suo tempo.

Le miserrime condizioni dell' ambiente in cui il parassita fu riscontrato in quantità considerevoli (in una capsula Petri

lasciata aperta in sito per 5 minuti secondi si svilupparono circa 300 colonie) e sopra tutto lo stato deplorevole delle persone che abitano l' ambiente mi colpirono così sinistramente, che credetti opportuno uno studio metodico sul potere patogeno anche di questa rara forma di parassita vegetale.

Si tratta d'una famiglia (Ovi) di sei persone (marito e moglie, due figli, una zia e il nonno paterno), le quali tutte da parecchio tempo presentano i caratteri tipici della pellagra cronica con riacutizzazione primaverile, non ostante che da cinque anni usufruiscano, per circa due mesi all' anno, del beneficio del vitto della locanda sanitaria. Una miserrima capanna situata nella valle del Fornione (ai piedi del Monte Valestra) nel Comune di Baiso, assai angusta, priva di luce e di aria e oltremodo umida, costituisce l' unica abitazione di questi disgraziati *.

Merita quì di far notare come nella stessa valle esistano pure parecchie altre case rurali, in condizioni igieniche notevolmente migliori della suddescritta e nelle quali la pellagra è relativamente scarsa; mentre i contadini di questa plaga si nutrono tutti a un di presso nello stesso modo, facendomolto uso della farina di *mais*, specialmente nella stagione invernale.

Ecco ora in breve il risultato delle mie ricerche su questo parassita, eseguite allo scopo di studiarne le eventuali proprietà patogene e stabilire se anch' esso poteva esser considerato come un germe pellagrogeno; molto più che dall' esame del suddetto ambiente non si riscontrarono che assai pochi altri parassiti vegetali, nulle o rarissime tutte le altre specie di parassiti vegetali patogeni (Aspergilli e Penicilli), che di regola abbondano assai in simili ambienti.

Come al solito anche per lo studio dell'*Aspergillus Ochraceus* si fecero sugli animali tre serie di esperienze, cioè:

*a*) esperienze col germe mediante iniezioni endoperitoneali di emulsioni del germe stesso e prevalentemente di spore e iniezioni del germe *in toto*;

*b*) nutrizione con materiale infetto;

*c*) estrazione dei tossici.

* Questa capanna misura 6 m. di lunghezza, 4 m. di larghezza e 2 m. di altezza; è priva di finestre, non ha pavimento e nelle stagioni piovose vi sorge e scorre l' acqua.

Notisi però che la locale Commissione provinciale permanente per la cura della pellagra ha già ora provveduto a soccorrere la famiglia suddetta colla costruzione d' una casa igienica e daremo a suo tempo il risultato di questa cura profilattica.

## I. Esperienze col Germe.

*A.* Iniezioni endoperitoneali di emulsioni del germe.

Dovetti in questo caso rinunciare alle esperienze fatte con emulsioni ricavate da patine cresciute su liquido Raulin, perchè queste, essendo troppo coriacee e compatte, poco si prestano per esser emulsionate.

Mi limito perciò ad esporre le esperienze fatte con emulsioni ottenute da *mais* infettato artificialmente e triturato e poi filtrato attraverso a un panno.

1. Cavia di gr. 520. Iniezione di 8 cmc. di emulsione fatta con 4 cariossidi. Diminuisce di peso rapidamente discendendo in 7 giorni a 380; poi si rimette e aumenta ancora. Viene uccisa dopo 22 giorni.

Autopsia. - Esistono dei residui di una peritoneite fibrinosa diffusa e null' altro. Nulla agli organi interni.

2. Cavia di 580 gr. Inoculazione di 8 cmc. di emulsione fatta con 6 cariossidi. Diminuisce di peso. ma poi dopo 10 giorni ritorna al peso normale. Viene uccisa dopo un mese. All' autopsia nulla di notevole.

3. Cavia di gr. 610. Iniez. di 10 cmc. di emulsione fatta con 8 cariossidi infette: deperimento rapido e progressivo con morte al 9 giorno, pesando 400 gr.

Autopsia – Congestione notevole delle anse intestinali, che sono qua e là tra loro aderenti per un notevole essudato fibrinoso diffuso. Nulla di notevole ai reni, fegato, milza e polmoni.

4. Cavia di 560 gr. Iniezione di 10 cmc. di emulsione con 8 cariossidi infette. Deperisce rapidamente e muore dopo 8 giorni pesando 380 gr.

Autopsia - Congestione notevole delle anse intestinali ed essudato fibrinoso diffuso. Reni, fegato, milza e polmoni congesti e null' altro di notevole.

*B.* Inoculazione endoperitoneale di cariossidi infette.

1. Cavia di gr. 840. Inoculazione di 3 cariossidi. L' animale diminuisce di peso progressivamente nei primi 10 giorni, poi si rimette e viene ucciso dopo un mese.

1 La massima parte di queste esperienze furono fatte nel 1904 e precisamente nel mese di Agosto, con parassita sviluppatosi a temperatura ambiente, e nei mesi di Novembre e Dicembre dello stesso anno, con parassita fatto crescere alla stufa a 20-22°, che rappresentano l'*optimum* pel suo sviluppo. Le esperienze, però, vennero ripetute nel 1905 sia durante l' inverno e precisamente nel mese di Febbraio, sia durante la primavera nel mese di Aprile e Maggio, come vedremo più avanti, esponendo le proprietà patogene di questo germe in rapporto colle stagioni dell' anno.

Autopsia - Le cariossidi si trovano in istato quasi completamente libero nel cavo peritoneale e ben pulite all' esterno e senza traccie del germe; gli organi interni sono di aspetto pressochè normale.

Esame colturale del cavo peritoneale e degli organi, negativo.

2. Cavia di 590 g. Inoculazione di 6 cariossidi infette. Deperimento progressivo e morte dopo 7 giorni, col peso di 380 gr.

Autopsia. Le cariossidi si trovano quasi completamente libere nel cavo peritoneale, ben pulite alla loro superficie esterna e senza traccia del fungo, il quale, al momento dell'inoculazione, copriva gran parte delle cariossidi stesse. Congestione notevole delle anse intestinali e degli organi interni.

Esame colturale del cavo peritoneale, del fegato, milza e reni negativo

3. Cavia di 610 gr. Inoculazione di 7 cariossidi infette. Deperimento rapido, con morte dopo 7 giorni. Peso gr. 460.

Autopsia. Reperto analogo a quello del caso precedente.

4. Cavia di 530 gr. Inoculazione di 8 cariossidi; morte dopo 35 ore.

Autopsia. Lieve essudato sieroso peritoneale. Congestione intensa delle anse intestinali e degli organi interni.

Esame colturale fatto dell' essudato peritoneale dà risultato positivo. cioè, da sviluppo di *Asp. Ochraceus.* Risultato positivo danno pure le colture fatte dal fegato; mentre rimangono sterili le seminagioni fatte dalla milza e dai reni.

5. Coniglio di 1500 gr. Inoculazione di 7 cariossidi infette. Morte in 25 ore.

Autopsia. Le cariossidi sono libere nel cavo peritoneale e le anse intestinali, come tutti gli organi interni sono notevolmente congesti.

6. Coniglio di 2600 gr. Inoculazione di 6 cariossidi. L' animale deperisce nei primi 5 giorni, ma poi si rimette e riacquista, dopo una settimana, il suo peso primitivo. Viene ucciso un mese dopo.

Autopsia. Le cariossidi sono avvolte da una sacca connettivale della grossezza di una noce e contenente poca sostanza caseosa. Congeste sono le anse intestinali. Il fegato, milza, reni, polmoni sono pressochè di aspetto normale.

7. Coniglio di 1900 gr. Inoculazione di 10 cariossidi. Muore dopo 12 giorni, pesando 1900 gr.

Autopsia. Le cariossidi sono chiuse in sacche contenenti liquido sieroso con pochi grumi caseosi. Scarsi e piccoli noduli biancastri ricoprono la superficie del fegato. Notevolmente congeste sono le anse intestinali e meno il fegato, i reni e i polmoni.

*C.* Inoculazione endoperitoneale di patine.

1. Coniglio del peso di 1900 gr. Inoculazione di 12 cmq. circa di patina recente bene sporificata e sviluppata su liquido Raulin. Deperimento rapido e morte dopo 7 giorni. Peritonite adesiva diffusa e congestione intensa delle anse intestinali. I frammenti di patina sono avvolti da grossa bisacca del volume di un uovo di gallina e contenente abbondante sostanza siero-caseosa. Noduli biancastri caseosi sono disseminati su tutta la superficie del peritoneo, del fegato e della milza. Congestione notevole di tutti gli organi interni.

2. Coniglio di 2000 gr. Inoculazione di 16 cmq. circa di patina recente e bene sporificata. Deperimento rapido e morte dopo 6 giorni.

Autopsia. Reperto analogo a quello del coniglio precedente.

Dai risultati avuti colle iniezioni endoperitoneali dell' *Aspergillus Ochraceus* appare evidente la intima analogia del suo potere patogeno con quello dell' *Asp. Niger.* Gli animali deperiscono rapidamente e muoiono con fenomeni di depressione generale, senza presentare il minimo sintomo di un eccitamento neuro-muscolare.

È notevole però il fatto che i fenomeni di reazione locale leucocitaria sieno in questo caso assai limitati in confronto a quanto si osserva coll'iniezione diretta degli altri Aspergilli fin qui da me studiati (*Fumigatus, Flavescens, Niger*), morendo gli animali in periodo di tempo relativamente breve e colle cariossidi infette presso a che libere nel cavo peritoneale.

Importa qui far notare ancora come il potere patogeno di questo parassita risulti più evidente quando esso proviene da patine coltivate sul liquido Raulin, che quando è cresciuto sul *mais*; sebbene ciò potrebbe anche essere dovuto probabilmente alla sua scarsa sporificazione quando si sviluppa su quest' ultimo mezzo nutritivo.

## II. Nutrizione.

Il potere tossico del parassita introdotto nell' organismo per la via gastro-enterica fu provato sottoponendo 5 cavie adulte, di oltre 600 gr., alla nutrizione di crusca mescolata con patina del parassita cresciuto sul liquido Raulin e poi essicata a temperatura ambiente. [Una patina (da capsula Tyndall) ogni 350 gr. di crusca].

1. Cavia di 740 gr. Deperisce rapidamente, ha diarrea e muore dopo 6 giorni, pesando 490 gr.

Autopsia. Congestione poco intensa delle anse intestinali e degli organi interni. Esame colturale fatto dal peritoneo, dal fegato e milza negativo.

2. Cavia di 610 gr. Deperisce, presenta un po' di diarrea al 5.° giorno e muore al 7.° giorno pesando 370 gr.

Autopsia. Reperto identico al precedente. Esame colturale negativo per tutti gli organi.

3. Cavia di 690 gr. Deperimento e morte dopo 6 giorni pesando 450 gr. Reperto anatomo-patologico e colturale eguale al precedente.

4. Cavia di 730 gr. Deperisce, presenta diarrea a incominciare dal 6.° giorno e muore al 9.° giorno pesando 500 gr.

Autopsia. Congestione delle anse intestinali più notevole del solito; nel cavo peritoneale si hanno poche goccie di essudato siero-sanguinolento; il fegato, milza e reni sono congesti. Nei polmoni si osservano qua e là focolai emorragici di data recente. Esame colturale negativo per tutti gli organi.

5. Cavia di 590 gr. Muore dopo 7 giorni pesando gr. 360. Congestione mediocre delle anse intestinali e di tutti gli organi interni, con focolai emorragici ai polmoni. Esame colturale negativo.

Le proprietà tossiche dell' *Aspergillus Ochraceus* risultano quindi evidenti anche quando esso entra nell' organismo animale per via gastro-enterica mediante una nutrizione infetta. Gli animali presentano fenomeni analoghi a quelli che si hanno coll' *Aspergillus Niger*. Mancano, cioè, i fatti di eccitamento neuro-muscolare e gli animali muoiono in uno stato di abbattimento e di deperimento progressivo. Non si è mai constatato poi il passaggio delle spore attraverso le pareti intestinali; il che finora si è ottenuto sperimentalmente solo coll' *Aspergillus Fumigatus*.

## III. Estratti Tossici.

L' estrazione dei tossici fu tentata anche in questo caso coll' ebollizione in acqua e in alcool, sia da patine di parassita coltivato in liquido Raulin, sia dal parassita cresciuto sul *mais*. L' estrazione con acqua fu fatta bollendo, per un'ora circa, delle patine in acqua distillata (200 cmc. di acqua ogni patina). L' estratto acquoso veniva poi, come al solito, filtrato e ridotto di volume mediante l' evaporazione a caldo.

### *A*. Estratti acquosi.

Esper. 1.ª L' estratto acquoso di 3 patine, bollite in 600 cmc. di acqua, viene ridotto a 35 cmc. Il residuo, di color caffè chiaro, quasi inodoro, ha reazione lievemente alcalina, non ha reazione fenolica ed è di un sapore acre amarognolo caratteristico che ricorda quello della tintura di corteccia di china. Viene iniettato a un cane e a due cavie.

1. Cane di 7500 gr. Iniezione endoperitoneale di 22 cmc. Dopo $^1/_2$ ora l' animale è preso da vomiti, si bistira, emette dei gemiti, specialmente se gli si palpa il ventre. Entra presto in uno stato di abbattimento e di sonnolenza caratteristica e rimane accovacciato con gli occhi chiusi e con un respiro lento e profondo. Obbligato a sollevarsi l'animale si sorregge difficilmente tenendo le gambe aperte e il muso appoggiato al suolo, come cercando un appoggio; ma poi finisce per ricadere presto quasi come addormentato. Non presenta tremori, nè alcun altro sintoma che parli per un eccitamento neuro-muscolare. I fenomeni di depressione persistono per tre giorni circa, durante i quali l' animale nè mangia, nè beve e non ha diarrea. Al 4.° giorno si è alquanto rimesso, beve avidamente e mangia. Dopo 10 giorni si può ritenere del tutto ristabilito.

2. Cavia di 500 gr. Iniezione di 5 cmc. di estratto acquoso. Muore dopo 4 giorni con fenomeni evidenti di abbattimento. All' autopsia non si osserva che un lievissimo grado di congestione intestinale.

3. Cavia di 450 gr. Iniezione di 4 cmc. Muore dopo 5 giorni con fenomeni di abbattimento.

Autopsia. Nulla di notevole.

Esper. II.ª L' estratto acquoso di 2 patine, bollite in 400 cmc. di acqua, viene ridotto a 25 cmc. di volume, che si iniettano parte a un cane e parte a una cavia.

1. Cane di 12000 gr. Iniezione di 20 cmc. L' animale ha vomiti, emette forti gemiti e per oltre un' ora si arrotola al suolo dimostrando di avere forti dolori al ventre. Dopo 4 ore circa si accovaccia, sonnecchia e male si sorregge in piedi se è obbligato a sollevarsi. Il giorno successivo sembra alquanto rimesso, ma rimane sempre accovacciato e sonnecchia e non beve, nè mangia. Il ventre è sempre assai dolente alla palpazione. Al terzo giorno sembra rimesso e l' animale mangia; ma dopo $^1/_2$ ora è però ripreso da dolori intensi, grida e si arrotola di nuovo al suolo e durante la giornata ha tre scariche diarroiche. I fenomeni vanno gradatamente scomparendo e in seguito a qualche giorno il cane si rimette del tutto, come il precedente.

2. Cavia di 650 gr. Iniezione di 5 cmc. Muore con fenomeni di abbattimento in 18 ore.

Autopsia. Congestione delle anse intestinali, del fegato, reni e milza, ed essudato sieroso peritoneale.

*B.* Estratti alcoolici.

Esper. I.ª Due patine vengono bollite in 350 cmc. di alcool e il residuo, ripreso con 22 cmc. di acqua, ha reazione fortemente acida, non dà reazione fenolica ed è di sapore fortemente acre-amarognolo caratteristico.

Cane di 9 Kg. Iniezione di 20 cmc. L' animale ha tosto vomiti, ha intensi dolori al ventre, specialmente alla palpazione, e dopo 2 ore entra in uno stato di forte abbattimento e sonnolenza accompagnato da frequenti scariche diarroiche. Muore dopo 20 ore.

Autopsia. Abbondantissimo essudato siero-sanguinolento nel cavo peritoneale; congestione intensa del peritoneo e delle anse intestinali. La mucosa intestinale è ricoperta di muco sanguinolento e lascia scorgere numerosi focolai emorragici nel tessuto sottostante. La massa encefalica, polmoni, fegato, milza e reni sono fortemente congesti.

ESPER. II.ª Due patine vengono bollite in alcool e il residuo raccolto con 20 cmc. di acqua che si inietta a un cane di 10 Kg. L' animale è preso da vomiti, emette qualche gemito ed entra presto in uno stato di abbattimento e sonnolenza rimanendo accovacciato. Il ventre è assai dolente alla palpazione. In questo stato rimane per tre giorni, sempre rifiutando di bere e di mangiare, ma presentando frequenti scariche diarroiche. Al 4.° giorno l' animale mangia, ma subito dopo è preso da intensi dolori al ventre, guaisce e cerca di comprimere il ventre al suolo. Gli stessi fenomeni si ripetono al 5° e al 6° giorno. L' animale deperisce perdendo oltre 2 Kg. in peso e muore dopo 10 giorni rimanendo sempre in uno stato di abbattimento caratteristico.

Autopsia. Nulla di notevole si riscontra tranne un lieve stato di congestione del peritoneo e di tutti gli organi interni.

ESPER. III.ª Vengono bollite in 700 cmc. di alcool 500 gr. di *mais* da un mese infettato artificialmente di *Aspergillus Ochraceus*. (Le cariossidi sono più o meno ricoperte dal parassita, specialmente in corrispondenza dell' ilo), e il residuo viene ripreso con 25 cmc. di acqua.

*a)* Cane di Kg. 8. Iniezione di 21 cmc. L' animale vomita, entra in uno stato di abbattimento caratteristico e presenta il ventre dolente alla palpazione. I fenomeni non sono però gravi e l' animale dopo 24 ore si può dire rimesso e mangia senza alcun inconveniente.

*b)* Cavia di 700 gr. Iniezione di 3 cmc. L'animale sopravvive senza alcun fenomeno di abbattimento.

Da queste esperienze risulta quindi evidente che anche l' *Asper. Ochraceus* è capace di elaborare un tossico estraibile non solo coll' alcool, ma anche coll' acqua e che i suoi caratteri sono sempre quelli di un tossico ad azione deprimente, analoga a quella dell' *Asper. Niger* e di alcune varietà di *Penicillum Glaucum*.

Da queste ultime esperienze risulta però ancora che il potere patogeno dell' *Asper. Ochraceus* è superiore notevolmente a quello dell' *Asper. Niger*, bastando di solito l' estratto alcoolico di 2 patine per uccidere con gravissimi fenomeni d' intossicamento acuto anche un cane di grosso taglio ; mentre per l' *Asper. Niger* occorse l' estratto di 4 patine per arrivare a questi risultati.

Anche dai risultati avuti cogli estratti acquosi questa maggior tossicità dell' *Asper. Ochraceus* di fronte al *Niger* è apparsa pure evidente.

Solo alcune varietà di *Penicillum Glaucum* a tossici deprimenti, come dimostrerò a suo tempo, hanno un grado di potere tossico paragonabile a quello dell' *Asper. Ochraceus.*

Faccio ancora rimarcare come il potere tossico anche cogli estratti è risultato notevolmente più accentuato quando il germe era cresciuto sul liquido Raulin che quando era cresciuto sul *mais*; ma questo, ripeto, potrebbe esser messo in rapporto colla scarsa sporificazione del fungo quando si sviluppa su questo ultimo mezzo nutritivo.

Qualunque sia la causa di questo fatto, richiamo quì su di esso l' attenzione, risultando così ancora evidente come il *mais* per sè stesso non può avere che un valore secondario nella produzione dei tossici di questi parassiti ; molto più che il tossico fabbricato da questo aspergillo, analogamente a quello dell' *Asper. Niger,* si diffonde anche ai mezzi nutritivi su cui il parassita si sviluppa, come potei dimostrare con esperienze apposite, eseguite col liquido Raulin che aveva servito di coltura al germe stesso.

Devo però quì far notare che la diffusione del tossico al mezzo nutritivo su cui si sviluppò il parassita avviene di solito in modo assai limitato. Solo iniettando a un cane di piccolo taglio (6100 gr.) il liquido Raulin concentrato e che servì allo sviluppo di 6 patine, potei ottenere dei fenomeni di intossicamento acuto e la morte dell' animale.

Nè il liquido colturale, nè gli estratti alcoolici o acquosi del parassita stesso non hanno però mai dato la reazione fenolica; il che dimostra una volta ancora che i corpi fenolici elaborati da alcuni ifomiceti non possono avere una grande importanza patogenica nella pellagra, come vorrebbe ammettere il Gosio.

Questo Aspergillo che mantenne invariata la sua attività tossica sino al Dicembre, coltivato invece di nuovo alla stufa circa tre mesi dopo, si dimostrò notevolmente attenuato.

Il germe, infatti, riseminato nel Febbraio 1905, sempre nello stesso mezzo nutritivo (liquido Raulin), e messo a 20-22° di temperatura crebbe più lentamente del solito; le patine si completarono più difficilmente ed assunsero un aspetto più gelatinoso alla loro superficie inferiore. La sporificazione fu pure un po' meno abbondante e il feltro sembrava di un color giallo ocra più chiaro e più sbiadito di prima.

L' estratto alcoolico di due patine cresciute in queste condizioni inoculate a un cane di 9 Kg. non determinano che uno stato d' intossicamento a carattere sempre depressivo, ma poco intenso. L' animale non ha vomito, ha poche scariche diarroiche, presentasi depresso, abbattuto nelle prime 48 ore; ma poi beve, mangia e in una settimana si può dire rimesso nelle condizioni di prima.

Solo coll' estratto alcoolico di 3 patine, inoculate a un cane di 11 Kg., si ottiene in questo mese un grave stato di intossicamento analogo a quello che si ebbe nei mesi precedenti. L'animale però, anche questa volta, non presenta sintomi acutissimi, ma sub-acuti, e muore in uno stato di depressione progressiva con intense scariche diarroiche 6 giorni dopo l' iniezione.

Nell' Aprile e Maggio susseguenti le esperienze furono di nuovo ripetute, e l'*Asp. Ochraceus* seminato in liquido di Raulin è lasciato sviluppare sia alla stufa, sia alla temperatura ambiente; esso cresce ancora rapidamente come nell' anno precedente, sporifica di nuovo abbondantemente, dando al suo feltro colore e aspetto eguale a quello che avea presentato durante l' estate e l' autunno del 1904. Anche il grado del suo potere patogeno appare eguale a quello che avea presentato nell' anno precedente; di modo che ora l' estratto di 2 patine basta per uccidere nel periodo di 27 ore un cane di 10 Kg., il quale muore con tutti i sintomi di grave e tipico intossicamento sopra descritto per le esperienze fatte nell' 1904. Notisi poi che la seminagione del germe in questo mese era stata fatta da colture vecchie, che avevano servito per la seminagione anche nelle esperienze precedenti.

L' attenuazione osservata nel Febbraio 1905 è dunque stata un semplice fatto transitorio, avendo il germe riacquistato il suo grado normale di tossicità nella primavera successiva. Si tratta quindi anche qui, in poche parole, di un rapporto tra il ciclo biologico annuale del parassita e le diverse stagioni dell'anno, come

già ho dimostrato per l' *Aspergillus Fumigatus* e per molte varietà tossiche di Penicilli. Anche questo parassita, cioè, in alcuni mesi dell' inverno entrerebbe in una fase di vita latente, durante la quale, anche quando venga messo nelle condizioni di temperatura che corrispondono all' *optimum* pel suo sviluppo, esso vegeta abbastanza bene, ma presentando dei caratteri di uno stato degenerativo dal punto di vista botanico (patine incomplete, più mucilaginose del solito e con un feltro più raro e di color giallo ocra più chiaro, più sbiadito). Nello stesso tempo presenta il fungo uno stato di attenuazione dal punto di vista delle proprietà patogene, non potendo mai in questa stagione raggiungere quel grado di tossicità che possiede quando viene coltivato durante la fase di vita attiva. Ora questa fase di vita attiva nel caso attuale dovrebbe corrispondere in natura in modo particolare, almeno al nostro clima, alla primavera e all' autunno, sviluppandosi questo germe difficilmente oltre il 25°-30°, cioè, alla temperatura media estiva del nostro paese. Insisto su questo fatto per il valore che viene ad acquistare nella genesi della pellagra, rispetto alle diverse stagioni dell' anno e rispetto ancora al clima delle diverse zone infette da pellagra.

L' *Aspergillus Ochraceus* dunque è capace di elaborare dei tossici potentissimi, i quali, come quelli dell' *Aspergillus Niger*, sono in modo costante a caratteri esclusivamente deprimenti. Per cui noi possiamo ora ammettere come dimostrato che gli Aspergilli pure, come i Penicilli, dal punto di vista patogeno si devono dividere in due gruppi principali: gli uni capaci di elaborare dei principi tossici a proprietà eccitanti e convulsivanti; gli altri capaci di elaborare dei tossici a proprietà paralizzanti, deprimenti.

L' *Asper. Ochraceus* apparterrebbe dunque, secondo quanto ebbi già varie volte a sostenere nelle mie memorie precedenti sulla patogenesi della pellagra, al gruppo di parassiti vegetali che, pei caratteri specifici dei loro tossici, devono essere considerati in diretto rapporto di causa specialmente colle forme di pellagra cronica; con quelle forme, cioè, a decorso lento e caratterizzate particolarmente da un deperimento fisico e da uno stato depressivo degli infermi.

La prova più eloquente di questa mia asserzione nel caso attuale l'abbiamo poi nelle condizioni morbose di tutti i membri della disgraziata famiglia che abita la catapecchia su descritta

e dalla quale si isolò in quantità notevole il parassita che formò oggetto delle presenti ricerche. Questi individui, come già dissi fin da principio, da parecchio tempo presentano infatti i sintomi tipici della pellagra cronica con riacutizzazione primaverile, non ostante che per due mesi dell'anno usufruiscano del beneficio d'una nutrizione sufficiente ed igienica, fornita dalla così detta Locanda sanitaria.

Ma su ciò ritornerò in un prossimo lavoro, rivolto a dimostrare l'intimo rapporto tra l'endemia pellagrosa e le condizioni antiigieniche degli ambienti e l'insufficienza della lotta odierna contro questa malattia.

## CONCLUSIONI

Le conclusioni che possiamo trarre per ora sono:

1. L'*Asper. Ochraceus* fu isolato in quantità considerevoli e in coltura quasi pura solo da un ambiente malsano dell'Appennino e abitato da una famiglia affetta da pellagra cronica.

2. Questo ifomiceto è patogeno ed è capace di elaborare dei tossici a caratteri evidentemente deprimenti, analoghi a quelli dell'*Asper. Niger* e di molte varietà di *Penicillum Glaucum*. Il grado di tossicità dell'*Ochraceus* è però notevolmente superiore a quello del *Niger* e di molte varietà di *Penicillum Glaucum*.

3. Le proprietà patogene risultano cogli identici sintomi d'intossicamento a caratteri depressivi, sia introducendo direttamente il germe nell'organismo animale con iniezioni endoperitoneali o per via gastro-enterica mediante una alimentazione infetta qualsiasi, sia introducendo i tossici specifici da esso isolati.

4. I tossici sono estraibili tanto coll'acqua, quanto coll'alcool, mediante l'ebollizione.

5. I tossici si diffondono anche ai mezzi colturali, sebbene sempre in grado molto limitato.

6. Il potere patogeno non ha alcun rapporto coi composti fenolici.

7. Questo germe, dati i caratteri dei suoi principi tossici, deve esser considerato in rapporto di causa specialmente colle forme di pellagra cronica.

8. L'attività tossica di questo parassita varia colle diverse stagioni dell'anno, e presenta il suo *maximum* nella

primavera, estate e autunno, mentre presenta il suo *minimum* nell'inverno, se anche coltivato ad un grado di temperatura che corrisponda all' *optimum* del suo sviluppo.

---

## BIBLIOGRAFIA.


Ceni. Gli Aspergilli nell' etiologia della pellagra. *Rivista Sperimentale di Freniatria* 1902, fasc. 2.

Ceni e Besta. Ueber die Toxine von *Asp. fumigatus* und *flavescens* und deren Beziehungen zur Pellagra. *Centralblatt fur Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie* 1902. Vedi anche *Rivista sperimentale di Freniatria* Vol. XXVIII, 1902.

Ceni. Sulle proprietà patogene del *Penicillum Glaucum* nell' etiologia della Pellagra. *Rivista sperimentale di Freniatria* Vol. XXIX, 1903.

Ceni e Besta. I Penicilli nell' etiologia e nella patogenesi della Pellagra. *Rivista sperimentale di Freniatria* 1903.

Ceni. Nuove ricerche sullo sviluppo degli Aspergilli in rapporto colla diffusione della pellagra. *Rivista sperimentale di Freniatria* 1903.

Id. Le proprietà tossiche dell' *Asp. fumigatus* in rapporto colle stagioni dell' anno. *Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie u. z allgem. Path.* 1904. Vedi anche *Rivista sperimentale di Freniatria* Vol. XXX, 1904.

Id. Nuove ricerche sulla Pellagra nei polli. *Id.* Vol. XXX, 1904.

Id. Le proprietà tossiche di alcuni ifomiceti (Aspergilli e Penicilli) in rapporto colle stagioni dell' anno. Comunicazione fatta al XII Congresso della Società Freniatrica Italiana in Genova, Ottobre 1904. Vedi *Rivista pellagrologica italiana* 1904.

Ceni e Besta. Die pathogenen Eigenschaften des Aspergillus Niger mit Bezug auf die Genese der Pellagra. *Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie u. z. allgem. Pathol.* 37 Band. 1904. Vedi anche: Il potere patogeno dell' *Aspergillus Niger* in rapporto colla Pellagra. *Rivista sperimentale di Freniatria* Vol. XXX, fasc. IV, 1904.

Ceni. Di alcuni caratteri biologici dei penicilli in rapporto colle stagioni e col ciclo annuale della pellagra. *Atti del III. Congresso di Patologia generale in Roma.* Aprile 1905. Vedi anche *Rivista pellagrologica* 1905.


---

### SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA.

*Fig. 1.* - Aspetto del feltro di una patina di 10 giorni di *Aspergillus Ochraceus* durante la fase della sua massima attività tossica. (Coltura in liquido Raulin).

*Fig. 2.* - Apparecchio conidifero dell' *Aspergillus Ochraceus*. Ingrandimento 175 diametri).

---



Fig. II



Fig. I.


LONDON SCHOOL OF
LIBRARY

Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

## E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

**PROF. A. TAMBURINI**

IN UNIONE AI PROF.RI

**G. GOLGI, E. MORSELLI, A. TAMASSIA. E. TANZI**



La **Rivista** si pubblica in **fascicoli trimestrali.**

**PREZZO DI ASSOCIAZIONE**

Per l'Italia **L. 20** Per l'Estero **L. 24.**

Un fascicolo separato costa **L. 5,00.**

Le domande di associazione devonsi dirigere alla *REDAZIONE DELLA RIVISTA DI FRENIATRIA, PRESSO L' ISTITUTO PSICHIATRICO S. MAURIZIO, REGGIO-EMILIA.*

S'intende continuata l'associazione per l'anno venturo, quando non è disdetta un mese innanzi alla fine dell'anno

Di ogni pubblicazione scientifica interessante il giornale, di cui sia inviata copia alla Redazione, sarà dato annunzio nel bollettino bibliografico.

I reclami per fascicoli mancanti debbono esser fatti entro un trimestre.

La Rivista accorda in dono agli autori 50 copie dei loro scritti; per le copie in più si metterà a loro carico la sola spesa di tiratura e carta.

Ai Librai si accorda lo sconto del 10 per cento.

L'associazione nei paesi esteri, che hanno aderito all'accordo postale di Vienna del 1892, può esser fatta anche presso i rispettivi Uffici postali e in tal caso il prezzo annuo d'associazione è di **L. 20.**

*Ueberreicht vom Verfasser.*




---

Abdruck

aus:

# „Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie“

begründet von

**Dr. Ernst Ziegler,**

weil. Professor der allgem. Pathologie und pathol. Anatomie a. d. Universität Freiburg i. Br.,

herausgegeben von

v. Baumgarten in Tübingen, Bendz in Lund, Beneke in Königsberg i. Pr., Bollinger in München, Borst in Göttingen, Bostroem in Gießen, Chiari in Prag, Eppinger in Graz, Ernst in Zürich, Fibiger in Kopenhagen, Foà in Turin, Golgi in Pavia, Griffini in Genua, Hauser in Erlangen, Homén in Helsingfors, Klebs in Hannover, Klemensiewicz, in Graz, Langhans in Bern, Löwit in Innsbruck, Lustig in Florenz, Martinotti in Bologna, Nauwerck in Chemnitz, Neumann in Königsberg i. Pr., Paltauf in Wien, Pertik in Budapest, Podwyssozki in Odessa, Reddingius in Groningen, Ribbert in Bonn, Schottelius in Freiburg i. Br., Schmorl in Dresden, Spronck in Utrecht, Stilling in Lausanne, Stroebe in Hannover, Thoma in Magdeburg-Sudenburg, Tizzoni in Bologna, Weichselbaum in Wien

redigiert von

**L. Aschoff** und **F. Marchand**
in Marburg. in Leipzig.

**Neununddreißigster Band. 1906.**

Verlag von Gustav Fischer in Jena.






# VII.

# Über eine neue Art von Aspergillus varians

## und seine pathogenen Eigenschaften in bezug auf die Ätiologie der Pellagra.

Von

**Carlo Ceni,**
Direktor der wissenschaftlichen Laboratorien.

Aus dem psychiatrischen Institut zu Reggio-Emilia.

**Hierzu Tafel V.**

---

Im folgenden will ich eine bis jetzt selbst in der Botanik unbekannte Form von Aspergillus, die sowohl wegen ihrer morphologischen Merkmale, wie wegen ihrer pathogenen Eigenschaften ein besonderes Interesse verdient, vor allem wegen der Bedeutung, die letztere bei der Ätiologie der Pellagra gewinnen können. Der Pilz (Hyphomyces) wurde von mir im Sommer 1904 im hohen Apenningebirge von Reggio (870 m über dem Meeresniveau) aus der Luft isoliert, und zwar in einer Wohnung der Gemeinde zu Busana, die aus zwei kleinen sehr feuchten und überaus wenig gelüfteten Zimmern im Erdgeschoß bestand und von einer Frau bewohnt war. Sie ist 37 Jahre alt und leidet seit einiger Zeit an chronischen Pellagra; ihr Mann starb 1903 in unserem Institut unter den Erscheinungen einer typischen Form von Pellagramelancholie.

Diese Frau zeigt zurzeit einen kachektischen Zustand mit erheblicher Atrophie der Muskelmassen und der Schleimhäute, sie ist schwer anämisch und zeigt Erytheme an den Händen; ferner leidet sie an schwerem Kopfweh, Schwindel und vagen Bauchschmerzen. Die Sehnenreflexe sind sehr gesteigert, und es entsteht oft Diarrhoe.

Alle diese Erscheinungen erfahren eine ausgesprochene Verschlechterung im Frühjahr und seit einiger Zeit auch im Herbst, obwohl die Kranke seit Jahren die Nahrung des Krankenhauses genießt.

Zunächst will ich die botanischen Hauptmerkmale des von mir in erheblicher Menge und fast in Reinkultur aus der oben genannten Wohnung isolierten Pilzes kurz zusammenfassen.[1])

Dieser Aspergillus besitzt zunächst die Eigenschaft, die Farbe des Filzes seiner Kulturrasen, je nach den verschiedenen Jahreszeiten, zu wechseln und erinnert dadurch an die von Wehmer[2]) beschriebene Form von Aspergillus varians: er unterscheidet sich jedoch erheblich von dieser Art durch verschiedene morphologische Merkmale. Unser Aspergillus könnte immerhin unter den Arten von grünen Aspergillen eingereiht werden, da bei ihm die grüne Farbe vorherrscht, besonders während der Perioden seiner größten Entwicklung, zumal weil diese Perioden mit den Phasen seines größten pathogenen Vermögens, wie wir sehen werden, zusammenfallen.

Jederzeit zeigen sich die untere und die obere Fläche des Pilzrasens anfangs immer schneeweiß. In der Folge aber nimmt die obere Fläche des Pilzrasens während der Sporenbildung die unten zu besprechenden verschiedenen Farben an, während die untere Fläche beständig eine mehr oder weniger intensive ziegelrote oder weinhefenähnliche Färbung erhält.

Während der Wintermonate wächst dieser auf verschiedenen Nährböden reichlich gesäte und im Ofen bei seinem Temperaturoptimum gehaltene Pilz langsam, indem er zu seiner Sporenbildung 18—24 Tage braucht; unter diesen Bedingungen erscheint sein Filz einmal fleischfarben rötlich, einmal chromgelb, einmal hell ockergelb und einmal schließlich wie schmutziges Kochsalz aschgrau gefärbt. In den Fig. 1 und 2 werden zwei Winterpilzrasen treu wiedergegeben, die nach 23 bis 25 Tagen bei 22—24 ° C (einer Temperatur, die gerade dem Optimum dieses Pilzes entspricht) Sporen bildeten.

Im Frühjahr und Sommer wächst der Pilz hingegen immer sehr gut und rasch selbst bei Umgebungstemperatur, derart, daß er im allgemeinen in 6—7 Tagen zur vollkommenen Sporenbildung gelangt. In diesem Fall zeigt sich der Filz gewöhnlich grüngelblich oder olivengrün, oder auch dunkelgrün gefärbt. Die Filzfärbung zeigt jedoch noch erheblichere Modifikationen im Herbst, während welcher Jahreszeit der Kulturrasen einmal eine blaßgrüne Färbung, ein anderes Mal hingegen eine ganz charakteristische irideszierende, karminrote Färbung annimmt. (Taf. V Fig. 3, 4, 5).

Das Aussehen des Filzes ist jedoch nicht immer gleich, besonders wenn er die grüne Farbe zeigt; denn einmal handelt es sich um eine

---

[1]) In einer gewöhnlichen (mit Raulin'scher Flüssigkeit getränktes Fließpapier enthaltenden) Petri'schen Schale, 5 Min. offen an der Luft gelassen, entwickelten sich 98 Kolonieen dieses Pilzes, denen ganz wenige Kolonieen von Aspergillus fumigatus und Penicillium glaucum beigemischt waren.

[2]) Wehmer, Über einige neue Aspergillusarten, Botan. Centrbl. Bd. 80 1899.

glatte Oberfläche auf schneeweißem Boden, auf dem gleichgroße, wohl begrenzte Erhebungen von dunkelgrüner Farbe (Fig. 3) herausragen, während ein anderes Mal die Oberfläche stark runzelig ist und aus zahlreichen kleinen, dicht aneinander liegenden Erhebungen besteht (Fig. 4).

Der letzte Typus des Pilzrasens ist der häufigste, da er auch bei den im Winter entwickelten Pilzrasen vorkommt, wie aus Fig. 1 und 2 zu entnehmen ist, wobei die vorherrschende Farbe gelb und nicht grün ist.

Die Farbe der Frühjahr- und Sommerpatinae bleibt endlich für mehrere Monate fast unverändert; hingegen nimmt im Winter derselbe Kulturrasen innerhalb weniger Tage gewöhnlich die oben genannten verschiedenen Farben nacheinander an, bis sie schließlich meistens von der Erdfarbe wird.

Der Parasit gedeiht gut auf den verschiedenen Kulturmitteln: Weißbrot, Maisbrei, Mais, Kartoffeln, Bohnen, Getreide usw., noch besser auf der Raulinschen Flässigkeit. Der Kulturrasen, besonders wenn der Pilz auf Flüssigkeit wächst, zeigt sich gewöhnlich als sehr gefältelt, sowohl an der oberen, wie an der unteren Fläche; weist eine lederähnliche, hölzerne Konsistenz auf und ist leicht zerbrechlich. Das Temperaturoptimum des Pilzes schwankt, wie gesagt, zwischen 22—24 ° C; unterhalb 15 ° C wächst er überhaupt nicht, wie auch nicht oberhalb 30 ° C: während der kalten Jahreszeit wächst er also nicht bei Umgebungstemperatur; während er im Frühjahr, im Sommer und am Beginn des Herbstes dabei sehr gut gedeiht. Bei uns entwickelt er sich aber während der wärmsten Sommertage bei Umgebungstemperatur langsamer und dies erklärt die Tatsache, daß dieser Hyphomyces bisher bloß auf den Gebirgen vorgefunden wurde, an Orten, wo die Sommertemperatur immer mild ist.

Der conidientragende Apparat ist sehr klein, noch kleiner, als jener vom Aspergillus fumigatus; dünn, schlank, kurz und mit einfachen glatten Wänden versehen sind die fruchttragenden Fäden. Die letzten, welche von Scheidewänden quer geteilt werden, zeigen die Form von Bambusröhren; sie wachsen sehr dicht nebeneinander und verleihen dem Filz ein knotiges Aussehen, doch mit fast glatter Oberfläche.

Die Endanschwellung des Fadens ist für gewöhnlich leicht eirund und sehr selten rundlich. Die Sterigmen verzweigen sich in zwei, drei oder mehr; die primären sind kurz dick und mit konischer Form, mit der Spitze an dem Endbläschen des Fadens; während die sekundären Sterigmen drei- oder viermal länger wie die primären, schlank, dünn und ampullenförmig sind.

Der Faden, sein Endbläschen und die Sterigmen bleiben während aller Phasen der Pilzentwicklung farblos. Die Sporen, welche kugelig, sehr klein und in langen Ketten angeordnet sind, stellen den einzigen Teil des Parasiten dar, welcher gefärbt erscheint; im Gegensatz zu

anderen Aspergillusarten, z. B. zum Asperg. ochraceus, dessen ganzer conidientragender Apparat sich färbt.

Die nicht fruchttragenden Hyphen wachsen ebenfalls sehr dicht nebeneinander; unter ihnen sind einige, die jüngsten, jedoch sehr zart, dünn und gleichförmig den Fäden ähnlich; während die anderen vielgestaltig, mit eirundlichen oder rundlichen oder unregelmäßig gestalteten Anschwellungen versehen sind, welche hie und da kugelförmige Körnchen fast von der Größe der Sporen enthalten.

Bisher wurden jedoch keine wahren Perithecien vorgefunden.

Dimensionen. Der fruchttragende Faden ist 150—200 $\mu$ lang und 4—5 $\mu$ dick. Die Endanschwellung des Fadens zeigt ein Querdurchmesser von 10—12 $\mu$. Die primäre Sterigmen sind 6—7 $\mu$, und beinahe ebenso dick; die sekundären sind 18—20 $\mu$ lang und 2—3 $\mu$ dick. Die Sporen messen in ihrem Durchmesser 2—3 $\mu$.

Der Parasit verflüssigt langsam Gelatine; und ist manchmal geruchlos, während er auch manchmal nach eßbaren Pilzen riecht. Die Nährflüssigkeit (Raulin's) färbt sich mehr oder minder intensiv weinrot und wird stark alkalisch. Auch dieser Aspergillus, ebenso wie alle anderen von mir bisher untersuchten Aspergillen, vermag in keiner Periode seiner Entwicklung Phenolprodukte zu erzeugen.

Nun will ich die Ergebnisse meiner Untersuchungen über das pathogene Vermögen dieses Pilzes, die ich zu allen Jahreszeiten während etwa $1^1/_2$ Jahren in der unten angegebenen Zeitreihe methodisch ausgeführt habe, kurz zusammenfassen.

Die Versuche wurden, wie gewöhnlich, angestellt, sei es unter Anwendung des Parasiten in toto, indem man ihn den Tieren intraperitoneal direkt injizierte, oder mittels Ernährung mit infiziertem Material, sodann aber vornehmlich unter Anwendung von aus demselben Parasiten gewonnenen toxischen Extraktes.

Als Nährböden wurden auch diesmal hauptsächlich im Autoklaven sterilisierter Mais und Raulin'sche Flüssigkeit benutzt.

## I. Inokulation des Keimes.

Behufs der Untersuchung des pathogenen Vermögens des Parasiten in toto durch seine direkte intraperitoneale Einführung in die Tiere beschränkte ich mich hier auf die Inokulation der infizierten Maiskaryopsen, als solche, d. h. ohne Anwendung von $E_2$-mulsionen. Ich habe jedoch den Versuch zu zwei verschiedenen Jahreszeiten wiederholt, nämlich einmal im Winter, wenn der Parasit, selbst im Ofen bei seinem Temperaturoptimum gehalten, sich nicht sehr gut entwickelte, und einmal im Frühjahr, wenn der Parasit sich auf den durch das Sterilisierungsverfahren befeuchteten Karyopsen rasch und üppig selbst bei Umgebungstemperatur entwickelte.

Versuch I. 29. Januar 1905. Seit 30 Tagen künstlich infizierter und während dieser Zeit im Ofen zu 22° C gelassener Mais. Die Karyopsen sind, besonders am Hilus, von einer Schicht des Parasiten bedeckt, der immer eine typische aschgraue Farbe gezeigt hat.

1. Kaninchen von 2150 g Gewicht. Intraperitoneale Inokulation von sechs Karyopsen. Das Tier geht allmählich ein und stirbt unter Depressionserscheinungen später, mit einem Körpergewicht von 1600 g.

Sektion. Die Karyopsen liegen durch eine überaus dünne fibrinöse Schicht mit den Darmschlingen verklebt. Es fehlen Erscheinungen von lokaler leukocytärer Reaktion, und jedes andere Zeichen einer entzündlichen Irritation. Der Darm und die übrigen inneren Organe sind schwach blutüberfüllt.

2. Kaninchen von 1800 g Gewicht. Inokulation von fünf Karyopsen. Das Tier kommt leicht herunter und wird 36 Tage später getötet, als es 1600 g wog.

Sektion. Keine örtliche Entzündungsreaktion in der Peritonealhöhle; die Karyopsen werden von einer dünnsten fibrinösen Schicht umhüllt vorgefunden.

3. Meerschweinchen von 800 g Gewicht. Inokulation von drei Karyopsen. Das Tier kommt ein wenig in den ersten Tagen herunter, doch gewinnt es bald sein ursprüngliches Gewicht wieder, und wird nach 28 Tagen getötet.

Sektion. Nichts Bemerkenswertes; Befund wie bei den zwei vorangehenden Fällen.

Versuch II. 27. April 1905. Seit 14 Tagen künstlich infizierter und teils bei Umgebungstemperatur, teils im Ofen bei 22° C belassener Mais; in beiden Fällen wächst der Pilz üppig, indem er die Karyopsen rasch mit grünlich gefärbten Satina bedeckt.

1. Kaninchen von 2100 g Gewicht. Intraperitoneale Injektion von sechs Karyopsen. Das Tier stirbt 6 Tage später unter Erscheinungen von Depression und allgemeiner Abmagerung; sein Körpergewicht betrug 1420 g.

Sektion. Die Karyopsen liegen von einem großen mit käsigem Material gefüllten Sack umhüllt, der an den Darmschlingen adhäriert, die an der Berührungsstelle stark blutüberfüllt und mit Geschwüren bedeckt erscheinen. Der ganze übrigbleibende Darm, sowie alle inneren Organe wiesen schwache Kongestionen auf.

2. Kaninchen von 1950 g Gewicht. Inokulation von fünf Karyopsen. Das Tier stirbt unter Erscheinungen einer fortschreitenden Depression 20 Tage später mit einem Körpergewicht von 1120 g.

Sektion. Die Karyopsen liegen in zwei hühnereigroßen Säcken, die mit käsiger Substanz gefüllt und mit den Darmschlingen verwachsen sind, letztere sind an der Übergangsstelle intensiv blutüberfüllt. Der übrige Darm, die Milz, die Nieren und die Lungen zeigen Kongestion. Die Leber weist die Merkmale einer deutlichen Fettentartung auf.

3. Meerschweinchen von 750 g Gewicht. Inokulation von drei Karyopsen. Das Tier stirbt nach 5 Tagen mit einem Gewicht von 600 g.

Sektion. Der Befund ist ähnlich wie bei den zwei vorangehenden Tieren.

Durch diese zwei Versuchsreihen wird zunächst das pathogene Vermögen des Keimes nachgewiesen, deren Inokulation in toto den Tod der Tiere unter Erscheinungen einer allgemeinen Vergiftung und einer lokalen entzündlichen Reaktion herbeiführt, in ähnlicher Weise, wie es von uns schon für den Aspergillus Fumigatus, Flavesceus, Niger und Ochraceus beschrieben wurde.

Das pathogene Vermögen dieses Parasiten erscheint aber je nach den Jahreszeiten sehr veränderlich zu sein, denn es war am schwächsten während des Winters und am stärksten während des Frühjahrs.

Schon hier mache ich darauf aufmerksam, daß im Winter der mit einem beschränkten pathogenen Vermögen begabte Parasit langsam, und eine blaßgrüne Färbung annehmend, sich entwickelt hatte, obwohl er bei seinem Temperaturoptimum gehalten wurde; während im Frühjahr der mit einem erheblichen pathogenen Vermögen begabte Parasit sich rasch entwickelte, sowohl im Ofen, wie bei der Zimmertemperatur, die typische grünliche Färbung annehmend.

Sowohl in dem einen, wie in dem anderen Falle starben die Tiere, jedoch unter denselben Symptomen von Depression und fortschreitender Abmagerung, ohne jegliche Erscheinung von neuro-muskulärer Erregung.

## II. Ernährung.

Auch die pathogenen Folgen des in den Organismus auf den Magen-Darmweg eingeführten Parasiten wurden durch zwei, zu verschiedenen Jahreszeiten ausgeführte Versuchsreihen festgestellt; d. h. wie es bei der intraperitonealen Inokulation geschah, indem man nämlich den Tieren Nährmaterial verabreichte, das entweder mit frischen Winter- oder mit Frühjahrskulturen infiziert war.

**Versuch I.** Drei ausgewachsene Meerschweinchen werden mit Kleien (400 g) ernährt, die mit einem Pilzrasen von 15 cm Durchmesser gleichmäßig vermischt wurden. Der Parasit hatte sich bei 22 ° C auf Raulin'scher Flüssigkeit langsam entwickelt, und sein Filz nahm nach 25 Tagen eine unveränderlich bleibende hellockergelbliche Färbung (Taf. V Fig. 2) an.

Die Tiere gingen allmählich ein und starben binnen 13—14 Tagen unter Depressionserscheinungen.

Sektion. Die Magenschleimhaut zeigt sich blutüberfüllt und mit einer dicken Schicht von weißlichem, dichtem, fadenziehendem Schleime bedeckt. Die Darmschlingen weisen starke Kongestion auf, mit punktförmigen Blutungen unter der Schleimhaut, sie sind ferner mit einem serösen blutigen Schleim gefüllt. Kein Exsudat in der Peritonealhöhle. Mäßige Kongestion der Lungen, Leber und Nieren. Es wurden mehrere Kulturen aus den verschiedenen Organen auf Raulin'scher Flüssigkeit angelegt, doch fielen alle negativ aus.

**Versuch II.** 25. Mai 1905. Drei ausgewachsene Meerschweinchen werden mit Kleie (400 g) ernährt, der eine bei 22 ° C im Ofen 12 Tage lang belassene und einen olivengrün gefärbten Filz (Taf. V Fig. 4) aufweisende Patina von 14 cm Durchmesser gleichmäßig zugemischt wurde.

Die Tiere starben innerhalb 5—8 Tage unter Depressionserscheinungen.

Sektion. Dem vorausgehenden Versuch ähnlicher Befund; nur erscheinen die Kongestionen der inneren Organe intensiver. Die Kulturen aus den verschiedenen Organen fielen negativ aus.

Die pathogenen Eigenschaften der Parasiten treten also deutlich zutage, auch wenn er in den Organismus durch den Magendarmweg mittels einer infizierten Ernährung eingeführt wird. Die Tiere sterben ebenso wie bei direkter Inokulation, unter Erscheinungen von fortschreitender Depression und infolge einer Vergiftung durch die toxischen Substanzen, die derselbe Parasit während seines Aufenthaltes im Magendarmkanal erzeugt, ohne daß er die Magendarmwand passiert und in den Organismus eindringt.

Der Unterschied im Grad des toxischen Vermögens des Parasiten je nach den Jahreszeiten, in denen er sich entwickelte, wird ebenfalls durch die Ergebnisse dieses Versuchs völlig bestätigt, da es sich aus ihnen sehr deutlich ergibt, daß der Parasit im Winter eine geringere Menge toxischer Substanzen zu erzeugen vermag als im Frühjahr; obwohl, wie gesagt, man ihn sich bei derselben Temperatur und auf demselben Nährboden entwickeln ließ.

## III. Toxische Extrakte.

Die Gewinnung der toxischen Substanzen geschah wie gewöhnlich durch Kochen im Alkohol, besonders von Kulturrasen des auf Raulin'scher Flüssigkeit (im großen Erlenmeyer'schen Kolben) gezüchteten Parasiten, manchmal wurde auch infizierter Mais dazu verwendet. Diese Untersuchungen wurden in größerer Zahl als gewöhnlich vorgenommen, und wiederholte Male selbst nach kurzen Zeitabständen ausgeführt, um, wie wir sehen werden, alle möglichen Modifikationen zu ermitteln, die eventuell in der Natur der von diesen Parasiten zu verschiedenen Jahreszeiten erzeugten toxischen Substanzen auftreten können.

**Versuch I.** 17. Oktober 1904. Ein 23 Tage alter, im Ofen bei 22 ° C gewachsener Kulturrasen von 14 cm Durchmesser und mit einem zuerst rosa und dann grüngelblich gefärbten, dem Aspergillus flavescens sehr ähnlichen Filz, wird mit 300 ccm Alkohol $^1/_2$ Stunde lang gekocht; das ganze wird filtriert, eingedampft, und der Rest mit 15 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 8 ccm; das Tier stirbt unter Depressionserscheinungen 16 Stunden später.

Sektion. Schwache Kongestion im Bauchfell und in allen inneren Organen.

2. Meerscheinchen von 650 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Stirbt unter Depressionserscheinungen 16 Stunden später.

Sektion. Intensive Kongestion im Bauchfell und in allen inneren Organen.

**Versuch II.** 12. Dezember 1904. Ein 23 Tage alter, im Ofen bei 22 ° C gewachsener Pilzrasen von 14 cm Durchmesser und mit einem zuerst rosig und dann grüngelblich gefärbten Filz wird mit 200 ccm Alkohol gekocht. Der Rest aus dem alkoholischen Extrakt wird mit 18 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 600 g Gewicht. Injektion von 7 ccm. Das Tier stirbt unter Depressionserscheinungen innerhalb 16 Stunden.

Sektion. Schwere Kongestion im Bauchfell und in den inneren Organen.

2. Meerschweinchen von 720 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Tod binnen 20 Stunden unter Depressionserscheinungen.

Sektion. Wie oben.

**Versuch III.** 21. Januar 1905. Drei 27 Tage alte Pilzrasen von 12 cm Durchmesser und mit einem rotgefärbten Filz, der chromgelbe, mit Neigung zum Grün, gefärbte Flecken aufweist (Taf. V Fig. 1), werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Rest des Auszuges wird mit 30 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 560 g Gewicht. Injektion von 6 ccm. Das Tier stirbt unter Depressionserscheinungen 5 Tage später.

Sektion. Schwere Kongestion im Peritoneum und in den inneren Organen.

2. Meerschweinchen von 620 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Das Tier zeigt in den ersten 24 Stunden Depressionserscheinungen, doch erholt es sich dann wieder.

3. Ausgewachsener Hund von 7500 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. Das Tier zeigt Erbrechen; bleibt in seinem Lager liegen und gibt während mehr als 5 Stunden ununterbrochene Klagetöne von sich. Der Bauch zeigt sich bei der Palpation sehr schmerzhaft. In diesem Zustand bleibt das Tier etwa 14 Stunden; hierauf fängt es aber wieder an zu trinken und zu fressen und hat sich nach 4 Tagen wieder vollkommen erholt.

**Versuch IV.** 14. Februar 1905. Zwei im Ofen 22 ° C binnen 42 Tage langsam gewachsene Kulturrasen von 15 cm Durchmesser mit grüngelblichem Filz werden mit 350 ccm Alkohol gekocht. Der Rest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

Ausgewachsener Hund von 8500 g Gewicht. Injektion von 20 ccm. Das Tier zeigt Erbrechen und Streckbewegungen, dann tritt er bald in einen Zustand fortschreitender Depression ein, schlummert, kann nicht stehen und fällt wie ein Betrunkener auf eine Seite.

Die Atmung wird immer oberflächlicher und der Puls langsam. Tod nach 18 Stunden.

Sektion. In der Peritonealhöhle sind mehr als 100 ccm eines serösen blutigen Exsudats vorhanden. Das Bauchfell, sowie die Darmwände zeigen sich stark blutüberfüllt und mit zahlreichen punktförmigen Blutherden bedeckt. Die Darmschleimhaut weist ebenfalls eine schwere Kongestion und zahlreiche

Blutungen auf. Schwere Kongestion in allen inneren Organen, besonders in der Lunge.

**Versuch V.** 17. Februar 1905. In diesem Monate wurden zehn ERLENMEYER'sche Kolben gesät und alle wurden in den Ofen bei 22 ° C gesetzt. Alle Kulturen entwickelten sich langsam; unter ihnen zeigten zwei zur Zeit der Sporenbildung einen chromgelb gefärbten Filz und dienten zum Versuch A; während alle übrigen einen hellockergelb gefärbten Filz, ebenso wie jene des vorangehenden Monates, aufwiesen und zum Versuch B dienten.

Außerdem wurde in diesem Monate die toxische Substanz aus dem auf künstlich infizierten Mais gewachsenen Parasiten gewonnen, wie es sich aus dem Versuch C ergibt.

A. Zwei 28 Tage alte Kulturrasen von 14 cm Durchmesser mit chromgelbem Filz, der einige grünliche Flecken zeigt, werden mit 350 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

Ausgewachsener Hund von 7500 g Gewicht. Injektion von 20 ccm. Das Tier zeigt Erbrechen, Bauchschmerzen, besonders bei Palpation, tritt in einen Zustand fortschreitender Depression ein. Nach 24 Stunden schlummert es und kann kaum aufstehen, selbst wenn es die Beine auseinanderspreitzt und die Schnauze auf dem Boden hält. Die Atmung wird immer oberflächlicher und langsamer, das Herz schlägt unregelmäßig und zeigt schwache Töne. Der Hund stirbt nach 33 Stunden.

Sektion. Jedes Exsudat in der Peritonealhöhle fehlt. Bauchfell und Darmschlingen sind stark blutüberfüllt; im Darm zeigen sich zahlreiche Blutungen unter der Schleimhaut; ferner schwere Kongestion in allen inneren Organen, besonders in den Lungen.

B. Zwei 30 Tage alte Pilzrasen von 15 cm Durchmesser mit konstant hellockergelb gefärbtem Filz werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 30 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Hund von 6500 g Gewicht. Injektion von 20 ccm. Das Tier zeigt bald Erbrechen; in den ersten 24 Stunden auch Durchfall; es ist wasserscheu, sonst aber ohne weitere Vergiftungserscheinung. Keine Depression, Gang gut; der Bauch auch bei Palpation nicht schmerzhaft. Am nächsten Tage trinkt das Tier mit Gier Wasser, das es bald wieder mit reichlichem Schleim erbricht. In den darauffolgenden Tagen frißt es aber und säuft, so daß es sich rasch wieder vollständig erholt, obwohl am 3. Tage noch Neigung zum Erbrechen besteht.

2. Meerschweinchen von 730 g Gewicht. Injektion von 6 ccm. Das Tier zeigt in den ersten Stunden schwache Depression, erholt sich aber dann rasch wieder.

C. Im Autoclaven sterilisierter, und dann infizierter, im Ofen 28 Tage lang gelassener Mais zeigt Karyopsen, die von einer dünnen Schicht des Parasiten bedeckt sind, der mit hellaschgrauer, während 2 Monaten unveränderlicher Farbe gewachsen ist. 500 g dieses Mais werden mit 500 ccm Alkohol gekocht und der Rest des Auszuges mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

Ein ausgewachsener Hund von 11 kg Gewicht. Injektion von 20 ccm. Das Tier erbricht nicht, zeigt aber in den ersten 24 Stunden einen leichten Depressionszustand; der Bauch ist bei der Palpation schmerzhaft. Doch verschwinden diese Störungen rasch und das Tier hat sich nach 3 Tagen wieder vollkommen erholt.

**Versuch VI.** 2. März 1905. Drei im Ofen gewachsene, 27 Tage alte Pilzrasen von 13 cm Durchmesser mit einem hellockergelb gefärbten Filz werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 30 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 6 ccm. Das Tier sträubt bald die Haare, frißt aber nach 24 Stunden wieder, scheint sich zunächst zu erholen. In der Folge zeigt es aber Haarsträuben, frißt wenig und stirbt 7 Tage nach der Injektion.

Sektion. Nichts Bemerkenswertes.

2. Ein ausgewachsener Hund von 9700 g Gewicht. Injektion von 24 ccm. Das Tier zeigt Depression in den ersten 24 Stunden sowie häufiges Erbrechen, doch steht und geht es gut. Am 2. Tage scheint das Tier sich wieder etwas erholt zu haben, doch ist es immer wasserscheu und hat dann und wann Neigung zum Erbrechen. Am 3. Tage säuft und frißt es, gibt aber alles wieder von sich. Am 4. Tage kann das Tier fressen und saufen ohne jegliche Störung, und erholt sich dann rasch wieder.

**Versuch VII.** 5. Mai 1905.

A. Zwei 16 Tage alte im Ofen rasch entwickelte Pilzrasen von 14 cm Durchmesser mit einem typisch dunkelolivengrün gefärbten Filz (Taf. V Fig. 4) werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 600 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Das Tier stirbt unter schweren Depressionserscheinungen nach 7 Stunden.

Sektion. Kongestion im Peritoneum.

2. Ausgewachsener Hund von 8700 g Gewicht. Injektion von 12 ccm. Das Tier zeigt häufiges Erbrechen und Durchfall und tritt rasch in einen schweren Depressionszustand ein; nach 8 Stunden kann es kaum aufstehen, wobei die Beine gespreitzt und die Schnauze gegen den Boden gehalten werden. Der Depressionszustand nimmt zu und das Tier stirbt 20 Stunden später.

Sektion. Reichliches serös-blutiges Exsudat in der Peritonealhöhle; schwere Kongestion im Bauchfell mit zahlreichen, bis in die submuköse Darmschicht eindringenden Blutungen. Schwere Kongestion in den inneren Organen, vornehmlich in den Nieren.

B. Zwei binnen 16 Tagen im Ofen gewachsene Pilzrasen von 14 cm Durchmesser mit einem typischen, aus dunkelgrün gefärbten, auf einem weißen Boden (Taf. V Fig. 3) gut begrenzt herausragenden Erhebungen bestehenden Filz, werden mit 300 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 7 ccm. Das Tier stirbt nach 8 Stunden unter schweren Depressionserscheinungen.

Sektion. Kongestion im Peritoneum und in den anderen inneren Organen.

2. Meerschweinchen von 650 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Das Tier stirbt unter Depressionserscheinungen nach 9 Stunden.

Sektion. Diffuse Kongestion im Bauchfell und in allen inneren Organen.

**Versuch VIII.** 20. Juni 1905. Zwei 7 Tage alte bei Umgebungstemperatur rasch gewachsene Pilzrasen von 14 cm Durchmesser mit einem typisch olivengrün gefärbten Filz werden mit 350 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 800 g Gewicht. Injektion von 6 ccm. Das Tier zeigt schwere Depressionserscheinungen, frißt nicht, erholt sich aber wieder vollkommen.

2. Ausgewachsener Hund von 7500 g Gewicht. Injektion von 12 ccm. Das Tier zeigt während der ersten 24 Stunden häufiges Erbrechen, frißt und säuft 3 Tage nicht, bleibt immer in seinem Lager liegen, schlummernd, mit verlangsamtem Puls und Atmung. Er kann jedoch gut aufstehen und läuft schnell ohne jegliche Störung; sein Bauch scheint bei Palpation nicht schmerzhaft. Das Tier erholt sich in der Folge wieder.

**Versuch IX.** 7. Juli 1905.

A. Zwei 9 Tage alte, bei Umgebungstemperatur rasch gewachsene Pilzrasen von 14 cm Durchmesser und mit einem wie Schwefel grünlichgelb gefärbten Filz werden mit 350 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Ausgewachsener Hund von 7500 g Gewicht. Injektion von 15 ccm. Das Tier zeigt sich ungewöhnlicherweise etwas unruhig; während der ersten 24 Stunden treten Muskelzuckungen im ganzen Körper, vornehmlich aber in den Hinterbeinen ein, es geht schlecht, da die Beine steif und kontrahiert sind. Kein Erbrechen, keine Bauchschmerzen. Am 2. Tage verschwand jede Störung und der Hund frißt, säuft; so erholt er sich dann rasch wieder.

2. Meerschweinchen von 650 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Das Tier erscheint etwas deprimiert in den ersten Stunden, dann erholt es sich aber rasch wieder.

B. Drei 15 Tage alte Patinae von 12 cm Durchmesser und mit einem, ähnlich wie die vorangehenden, wie Schwefel gefärbten Filz werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 5 ccm. Das Tier sträubt die Haare und zeigt Steifheit der Beine, jedoch ohne Muskelzuckungen oder -zittern, frißt nicht und stirbt nach 32 Stunden.

Sektion. Leichter Grad von Kongestion im Bauchfell und in allen inneren Organen.

2. Ausgewachsener Hund von 12 kg Gewicht. Injektion von 15 ccm. Das Tier erbricht, ist unruhig und zeigt nach etwa $^1/_2$ Stunde intensives Zittern im ganzen Körper und alle typischen Merkmale einer Vergiftung durch tetanische pellagraerzeugende toxische Substanzen. Das Bild verschlimmert sich immer mehr; es treten tetaniforme Krämpfe, spastische Steifheit der Glieder und Trismus auf. Die Atmung wird dyspnoisch, es entsteht Tachykardie etc. In diesem Zustand bleibt das Tier etwa 24 Stunden, hierauf erholt es sich aber allmählich wieder; am 2. und 3. Tage verschwindet jede Störung, gleichwohl erscheint der Hund immer noch wasserscheu und deprimiert, ohne jemals Durchfall oder Bauchschmerz gezeigt zu haben.

**Versuch X.** 1. August 1905. Drei 11 Tage alte, bei Umgebungstemperatur rasch gewachsene Patinae von 14 cm Durchmesser und mit olivengrün gefärbtem Filz werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 30 cm Wasser wieder aufgenommen.

1. Ausgewachsener Hund von 10 kg Gewicht. Injektion von 20 ccm. Das Tier zeigt bloß einen leichten Depressionszustand, erscheint stumpfsinnig und bleibt in seinem Lager mit geschlossenen Augen liegen, steht jedoch gut auf und geht ebenfalls gut, ohne jegliche Störung. 12 Stunden später wird die übriggebliebene Auszugsmenge, d. h. weitere 10 ccm injiziert. Der Zustand des Tieres bleibt fast unverändert; kein Erbrechen, kein Bauchschmerz bei Palpation. 24 Stunden nach der Injektion zeigt sich das Tier immer deprimiert, regungslos, und schlummert; es säuft reichlich, zeigt doch Erbrechen und keinen Durchfall, ebenso keinen Bauchschmerz, steht auf und geht ziemlich gut, ohne Erregungs- oder Lähmungserscheinungen. In der Folge frißt das Tier und säuft, so daß es sich binnen wenigen Tagen vollkommen wieder erholt hat.

**Versuch XI.** 2. September 1905. Während dieses Monates wurde das toxische Vermögen des Keimes sowohl an einigen für diese Jahreszeit typischen karminrot gefärbten Kulturrasen, wie an anderen noch häufigeren blaßgrün gefärbten Kulturrasen gefärbt.

A. Zwei binnen 10 Tage bei Zimmertemperatur rasch gewachsene Kulturrasen von 12 cm Durchmesser mit karminrot gefärbtem Filz werden mit 250 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 790 g Gewicht. Injektion von 7 ccm. $^{1}/_{2}$ Stunde später tritt etwas leichtes diffuses Zittern auf, sowie schwache Muskelzuckungen. Das Tier erholt sich dann wieder.

2. Meerschweinchen von 700 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. Nach 20 Minuten zeigt das Tier typisches diffuses Zittern und sehr starke Muskelzuckungen, die von einem Erregungszustand begleitet werden. In diesen Zuständen stirbt das Meerschweinchen 26 Stunden nach der Injektion.

Sektion. Schwache Kongestion im Peritoneum und in den inneren Organen.

B. Zwei Pilzrasen von 12 cm Durchmesser mit einem hellblaßgrün gefärbten Filz werden mit 250 ccm Alkohol gekocht. Der Auszugsrest wird mit 20 ccm Wasser wieder aufgenommen.

1. Meerschweinchen von 680 g Gewicht. Injektion von 7 ccm. Das Tier erscheint nach einigen Stunden etwas deprimiert und mit gesträubten Haaren. 36 Stunden später Tod.

Sektion. Spärliches serös-blutiges Exsudat im Peritoneum; schwere Kongestion in allen inneren Organen.

2. Meerschweinchen von 780 g Gewicht. Injektion von 10 ccm. Das Tier zeigt bald einen Depressionszustand; das Haar wird gesträubt; Tod nach 30 Stunden.

Sektion. Reichliches serös-blutiges Exsudat im Peritoneum; schwere Kongestion im Peritoneum und in den inneren Organen.

Bemerkenswert ist in diesem Versuch die Eigenschaft, daß der zu derselben Zeit, unter denselben Bedingungen gesäte und gezüchtete Parasit zwei toxische Substanzen zu erzeugen hat: nämlich eine erregende, an die karminrot gefärbten Patinae gebunden, und eine deprimierende, die den grün gefärbten Patinae zukommt.

**Versuch XII.** 3. Oktober 1905. Drei bei Zimmertemperatur innerhalb 18 Tage langsam gewachsene und immer sehr blaßgrün gebliebene

Kulturrasen von 14 cm Durchmesser werden mit 400 ccm Alkohol gekocht. Der Rest wird mit 30 ccm Wasser wieder aufgenommen.

Ein junger Hund von 7550 g Gewicht. Es wird eine erste Injektion von 20 ccm gemacht. Das Tier zeigt aber kein Erbrechen, keinen Durchfall, keine Bauchschmerzen, selbst nicht bei Palpation; es geht gut und zeigt keine bemerkenswerten Vergiftungserscheinungen.

8 Stunden später wird der übriggebliebene Rest d. h. weitere 10 ccm injiziert; das Tier zeigt jedoch keine Vergiftungserscheinung, weder von erregender noch von deprimierender Natur, und am nächsten Morgen frißt und säuft es wie gewöhnlich.

Wir müssen also das toxische Vermögen des Parasiten in diesem Monat fast gleich Null betrachten, was in bedeutendem Gegensatz steht zu dem, was wir namentlich bei den vorherigen Frühjahrsmonaten beobachtet haben.

Aus den Ergebnissen dieser dritten Reihe von methodisch, ununterbrochen während mehr als 1 Jahres zu kurzen Zeitperioden von 20—30 Tagen ausgeführten Untersuchungen, geht also zunächst hervor, daß die neue von uns untersuchte Aspergillusart mit einem sehr ausgesprochenen pathogenen Vermögen begabt ist, welches von durch denselben erzeugten toxischen Substanzen abhängt, und die man durch die gewöhnlichen Extraktionsmittel isolieren kann.

Was uns aber in diesem Fall am meisten überrascht, sind die erheblichen Schwankungen sowohl im Grade wie in der Natur der toxischen, aus diesem Parasiten ausziehbaren Substanzen, Schwankungen die man von Jahreszeit zu Jahreszeit und oft auch von Monat zu Monat beobachten kann.

Hinsichtlich der Schwankungen im Giftigkeitsgrad während des jährlichen Lebenskreislaufes dieses Aspergillus haben wir hier eine neue Erscheinung vor uns, die wir bisher noch nicht bei den anderen zahlreichen von uns untersuchten pathogenen Arten von Hyphomyceten (Aspergillus- und Penicilliumarten) wahrnehmen konnten. Der vorliegende Parasit zeigt in der Tat nicht nur eine Phase ausgesprochener Abnahme in seiner toxischen Tätigkeit während des Winters, wie ich schon für die Aspergillus Fumigatus, Niger und Ochraceus und für die Mehrzahl der mehr als 60 botanischen Arten von grünen Pernicillien unserer Sammlung feststellen konnte; sondern er zeigte auch eine ähnliche Phase während des Sommers, während der heißesten Tage des Jahres. Der Parasit erreicht hingegen sein Maximum an Giftigkeit im Frühjahr und Herbst. Es genügt, einen Blick auf die Ergebnisse der einzelnen oben wieder gegebenen Versuche zu werfen, um einen genauen Begriff davon zu gewinnen.

Der Parasit, welcher im Herbst 1904 einen sehr erheblichen Giftigkeitsgrad gezeigt hatte, verlor während des darauffolgenden Winters in bedeutender Weise seine pathogene Eigenschaft, obwohl er im Ofen bei einer Temperatur gezüchtet war, die seinem Entwicklungsoptimum ent-

spricht; derart, daß die Dosen des alkoholischen Extraktes, die früher auf die inokulierten Tiere sicher tödlich wirkten, jetzt bloß einen sehr schwachen und vorübergehenden Vergiftungszustand hervorrufen.

Im Frühjahr gewinnt der Keim aber seine toxische Tätigkeit wieder, und wir sahen oben, daß in dieser Jahreszeit das alkoholische Extrakt von wenig mehr als einem Pilzrasen ausreicht, um einen Hund binnen wenigen Stunden (Vers. VII) unter schweren Erscheinungen zu töten; während dagegen im Winter der einen ebenso schweren Hund injizierte Auszug aus drei Pilzrasen nur Erscheinungen von schwacher und gänzlich vorübergehender Vergiftung (Vers. V, B und C, und Vers. VI) hervorrief.

Dieser während des Frühjahrs wiedererlangte Zustand von größter toxischer Tätigkeit dauert jedoch nicht lange Zeit; denn der Keim wird wieder hypotoxisch und beinahe unschädlich, wenn er sich während der heißen Monate des Jahres entwickelte. Die Ergebnisse der im Juni, Juli und August ausgeführten Versuche, während welcher Monate der Auszug aus dem Kulturrasen nicht einmal einen Zustand von merklicher Vergiftung geschweige denn den Tod bedingen, beweisen in einer klaren und unbestrittenen Weise diese zweite Periode von Hypotoxizität des Pilzes; eine Periode, ich wiederhole es, die ich zum ersten Male beim Studium der biologischen Entwicklung der pellagraerzeugenden Parasiten wahrnehmen und so deutlich feststellen konnte.

Diese Sommerperiode von verminderter oder gar aufgehobener toxischer Giftigkeit des Parasiten verdient, wie wir weiter unten sehen werden, von jedem Gesichtspunkt aus unsere Aufmerksamkeit; zumal weil, wie es aus den im September 1905 wiederholten Untersuchungen noch hervorgeht, wir von neuem sehen, daß der Pilz einen überaus hohen Giftigkeitsgrad wiedergewinnt, in einer ähnlichen Weise, wie er im Herbst 1904 beobachtet worden war.

Die im Sept. 1905 wiedererlangte toxische Tätigkeit dauert jedoch nicht für lange Zeit; sondern, wie es sich aus Vers. XII ergibt, verschwindet sie wieder vollkommen im darauffolgenden Oktober; während im vorigen Jahre der Parasit diese Eigenschaft, toxische Substanzen zu liefern, in den Monaten Oktober, November und Dezember allerdings in abgeschwächtem Grade noch behalten hatte.

Wenn auch die Perioden von geringster toxischer Tätigkeit während der zwei Herbste 1904—1905 nicht genau zusammenfallen, genügt es mir doch hervorzuheben, daß man hier jedenfalls nicht bloß von einem durch eine Winterperiode geringster toxischer Tätigkeit charakterisierten biologischen Parasitenzyklus steht; sondern vor einer wirklichen Aufeinanderfolge von zwei jährlichen Perioden geringster Tätigkeit, von denen vielleicht die eine, nämlich die Winterperiode, ihre Erklärung in dem den Pflanzen eigenen Zustand von Latenzleben während des Winters wohl finden kann, die andere hingegen immer noch unerklärt bleibt, falls man

nicht annehmen will, daß sie mit der zu hohen, der Entwicklung und der Äußerung der Stoffwechselfunktionen dieses Parasiten wenig günstigen Sommertemperatur in Zusammenhang steht.

Mit alledem will ich jedoch nicht in einer absoluten Weise behaupten, daß der jährliche Lebenskreislauf dieses Hyphomyceten in seinen verschiedenen Perioden von größter und geringster toxischen Tätigkeit mit denen von mir beobachteten genau zusammenfallen muß. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß der in Rede stehende Parasit unter anderen verschiedenen Klimabedingungen, als unsere, von einem Jahre zum anderen verschiedene Perioden von größter und geringster toxischen Tätigkeit aufweisen kann, auch wenn er immer in derselben Umgebung gezüchtet wird.

Mit großer Wahrscheinlichkeit verhalten sich diese Hyphomyceten, wie die Giftfilze im allgemeinen, für welche man ja weiß, daß sie, wenn auch zu derselben Art gehörig, nicht immer denselben Giftigkeitsgrad zeigen. Diesbezüglich will ich zwei Forscher erwähnen: Hegi [1]), der das Giftvermögen von Amanita phalloides an Tieren untersuchte, fand, daß der Tod mit 2—3 mal größeren Gaben als diejenigen die im vorigen Jahre tödlich wirkten, nicht zu erzielen war; und Böhm [2]) beobachtete, daß Amanita pantherina je nach den Jahren mehr mindergiftig war, und daß beim Boletus luridus die Cholin- und Muscarinmengen, die man ausziehen konnte, in verschiedenen Jahren sehr variierten. Dies würde die Widersprüche erklären, denen man so häufig im Kapitel der Pilzvergiftung in den toxikologischen Lehrbüchern begegnet; in ähnlicher Weise würde der Befund unserer Untersuchungen auch erklären, warum bis jetzt die Arten von Penicillium und Aspergillus als unschädlich von Forschern angesehen wurden, die sich auf wenige Versuche beschränkten, oder sie sehr wahrscheinlich während der durch geringste oder keine toxische Tätigkeit gekennzeichneten biologischen Perioden dieser Parasiten anstellten.

Noch bedeutungsvoller erscheinen aber in unseren Parasiten die Schwankungen, die man auch im Wesen der von ihm während der verschiedenen Jahreszeiten erzeugten toxischen Substanzen beobachtet hat.

Während in der Tat die von dem Hyphomyceten vom Oktober 1904 bis Juni 1905 erzeugten toxischen Substanzen deprimierender und paralysierender Natur sind und in ihrer Wirkung den Produkten jener Penicillium- und Aspergillusarten, die ich als „pellagraerzeugende Parasiten deprimierender und paralysierender Natur" bezeichnet habe, vollkommen entsprechen, liefert der immer auf denselben Nährboden im Monate Juli gewachsene Parasit ganz ähnliche ausziehbare Produkte, wie jene anderen Penicillien und Aspergillen, die ich unter die krampf-

---

1) Hegi, Deutsch. Arch. f. klin. Med. Bd. 65 p. 385.
2) Böhm, Arch. f. experim. Path. u. Pharmak. Bd. 19 p. 37.

erzeugenden und „pellagraerzeugenden Parasiten mit erregenden toxischen Substanzen“ klassifiziert habe. Dasselbe gilt für die während des Herbstes erhaltenen toxischen Produkte, wie es sich aus den Versuchen XI und XII ergibt.

Diese neue, ausgesprochene pathogene Aspergillusart mit wohl bestimmten morphologischen Charakteren, die sich unverändert in jeder Periode seines Lebenskreislaufes, in jeder Jahreszeit erhalten, zeigt also nicht bloß, wie wir schon eingangs gesehen haben, erhebliche Schwankungen im äußerlichen Aussehen der Kulturrasen und noch mehr in den charakteristischen Färbungen seines Filzes, sondern auch erhebliche überraschende Schwankungen sowohl in seinem Giftigkeitsgrad, wie sogar auch in der Natur der toxischen Substanzen. Er vermag je nach den Jahresperioden zwei ausziehbare toxische Produkte von verschiedener und entgegengesetzter Natur zu erzeugen, der eine von deprimierender und lähmender Natur, der andere von erregender und krämpfeerzeugender Natur, von denen wir bis jetzt glaubten, daß sie an verschiedenen Arten der pellagraerzeugenden pflanzlichen Parasiten gebunden seien.

Dadurch wird nun also die Möglichkeit bewiesen, daß ein und derselbe Parasit in verschiedenen Jahreszeiten zwei toxische Substanzen von verschiedener, ja entgegengesetzter Natur zu erzeugen vermag; und wir werden in einer nächsten Mitteilung sehen, daß diese doppelte Eigenschaft kein spezifisches absolutes Merkmal des in Rede stehenden Aspergillus darstellt, sondern sehr wahrscheinlich einer noch allgemeineren Tatsache entspricht, die auch bei anderen Arten und Varietäten von Penicillien und Aspergillien feststellbar ist.

Obwohl ich glaube, daß eine derartige Eigenschaft einiger Hyphomyceten, zwei toxische Substanzen von verschiedener und entgegengesetzter Natur erzeugen zu können immer schwer zu erklären bleiben wird, müssen wir uns vor Augen halten, daß eine ganz ähnliche Erscheinung schon für andere Pflanzen und zwar für die Giftpilze im allgemeinen, die schließlich mit den Hyphomyceten zu einer Familie gehören, festgestellt wurde.

In der Toxikologie weiß man in der Tat, daß die Vergiftungserscheinungen nicht bloß je nach der Art des sie bedingenden Pilzes variieren können, sondern daß sie auch einen verschiedenen Charakter annehmen können, selbst wenn die Vergiftung von der Einführung derselben Pilzart bedingt wurde.

Bei der Vergiftung durch Amanita phalloides und ihm verwandte Spezies wurden zusammen mit Magendarmstörungen schwere nervöse Störungen beschrieben, die einmal in wahren Krämpfen, einmal hingegen (und zwar häufiger) in einem Zustand von Somnolenz und Kollaps bestanden (Falck[1]), Weiss[2]).)

---

[1]) Falck, zitiert von Jaksch, Nothnagel's Handbuch der Pathologie.

[2]) Weiss, Wiener med. Wochenschr. Bd. 12—14 1897.

So sei auch von der Vergiftung durch einen anderen, ebenfalls ganz gemeinen Pilz, den Amanita muscaria dasselbe gesagt, bei welcher gewöhnlich zwar die Störungen im Gebiete des Magendarmsystems vorherrschen, jedoch auch Erscheinungen von psychischer Erregung, Betrunkenheit auftreten können, sehr ähnlich denjenigen, die man infolge von akuter Alkoholvergiftung beobachtet (KOBERT).[1])

Die Analogie zwischen den Vergiftungserscheinungen durch die Pilze in sensu strictori und denjenigen durch Penicillen und Aspergillen ist, so glaube ich, so augenscheinlich, daß ich nichts weiteres hinzuzufügen brauche, um deren Bedeutung nachzuweisen.

Was für Momente sind nun diejenigen, die beim Zustandekommen dieser zweifachen toxischen Eigenschaft unseres Parasiten eine Rolle spielen? Da es festgestellt wurde, daß die Natur des Nährbodens nicht die Ursache sein kann, weil wir immer die RAULIN'sche Flüssigkeit dazu verwendet haben, so bleibt auch in diesem Falle nichts anderes übrig, als an äußere Ursachen zu denken, z. B. an den Einfluß der Jahreszeiten, und ihrer verschiedenen Temperatur, oder auch an ein Gesetz, das den Lebenszyklus dieses Parasiten regelt. Da aber jede diesbezügliche Behauptung heute voreilig wäre, so werde ich mich hier darauf beschränken, einige Betrachtungen allgemeiner Natur über die mitgeteilten Erscheinungen auszuführen.

Daß zunächst die Jahreszeiten einen Einfluß auf die Stoffwechselfunktionen des Parasiten ausüben können, würde sich nicht bloß aus dem engen Zusammenhang zwischen denselben Jahreszeiten und den verschiedenen Perioden der toxischen Tätigkeit des Parasiten ergeben, sondern auch aus dem von uns ebenfalls festgestellten Zusammenhang zwischen dem Giftigkeitsgrad und der typischen Farbe desselben Pilzes, wobei die Farbe ebenfalls offenbar an die verschiedenen Jahreszeiten gebunden ist.

Schon in einer vor kurzem erschienenen Mitteilung von mir über die biologischen Charaktere der Penicillien in bezug auf die Jahreszeiten und den jährlichen Pellagrazyklus hob ich den engen Zusammenhang hervor, der vornehmlich bei einigen Varietäten zwischen den Schwankungen in der typischen Farbe des Pilzes und seinem pathogenen Vermögen im Laufe des Jahres besteht. Ich bemerkte nämlich, daß nicht selten im Winter die Penicillien, auch wenn sie bei einer ihrem Entwicklungsoptimum entsprechenden Temperatur gezüchtet werden, gleichzeitig mit einer Verminderung oder selbst vollständigem Schwinden ihrer toxischen Eigenschaften, auch ihre typischen Farben allmählich einbüßen, die während der anderen Jahreszeiten ein wertvolles botanisches Differentialmerkmal darstellen.

[1]) KOBERT, zitiert von JAKSCH, Nothnagel's Handbuch der Pathologie.

Während dieser Periode von geringster toxischer Tätigkeit weisen in der Tat diese Hyphomyceten ganz verblaßte Farben auf, bilden spärliche Sporen und zeigen leicht lange weiße Bärte, die schließlich den Kulturrasen der verschiedenen Arten ein gleichförmiges Aussehen verleihen, und so erschweren sie die Unterscheidung ihrer verschiedenen Arten und Varietäten.

Beim in Rede stehenden Aspergillus erscheinen nun diese Schwankungen in der Filzfarbe die höchsten Stufen zu erreichen, und manchmal so ausgesprochen zu sein, daß man dadurch irregeleitet werden, und selbst glauben kann, es handele sich um verschiedene Pilze, nicht bloß die Schwankungen der Farbe sind nun an verschiedene Jahreszeiten gebunden, sondern es scheint auch, daß sie, wenn auch nicht in einem konstanten, so doch in einem häufigen Verhältnisse zu dem Grad und der Natur der toxischen Produkte desselben Pilzes stehen. Es wäre mithin nicht unwahrscheinlich, daß auch die Schwankungen, die im pathogenen Vermögen des Pilzes stattfinden, mit den Jahreszeiten in Verbindung ständen.

Während des Winters z. B. nehmen sehr selten die Kulturrasen dieses Aspergillus eine grünliche Farbe an, sondern sind für gewöhnlich entweder blaßrötlich, oder chromgelb, oder — am häufigsten — okergelb gefärbt. Die diese Farben aufweisenden Winterkulturen zeigten sich beständig mit einem sehr geringen Giftigkeitsgrad begabt; dagegen zeigten die Kulturrasen mit intensiven grellen Farben, und zwar diejenige mit einer dunkelgrünen oder gelblichgrünen Färbung, die Kulturrasen nämlich, die während der anderen Jahreszeiten zur Beobachtung kommen, den größten Giftigkeitsgrad. Dasselbe gilt für die im Herbst beobachteten karminrot gefärbten Kulturrasen, die ebenfalls mit einem starken toxischen Vermögen begabt sind.

Minder deutlich trat hingegen das Verhältnis zwischen der Farbe des Parasiten und der Natur der von ihm erzeugten toxischen Substanz auf; denn, wie es aus den oben mitgeteilten Versuchen hervortritt, sehen wir, daß sowohl die toxische Substanz deprimierende, wie jene erregender Natur aus Kulturrasen von verschiedener Farbe erhalten werden können. Jedenfalls sei bemerkt, daß die toxische Substanz deprimierender Natur besonders in den Kulturrasen mit verblaßten und wenig intensiven Farben wahrgenommen wurde, während die toxische Substanz erregender Natur fast ausschließlich in den Kulturrasen mit grellen Farben, in jenen, nämlich die wie Schwefel (Sommer) und karminrot (Herbst) gefärbt waren, gefunden wurde.

Damit will ich aber nicht behaupten, daß beim gegenwärtigen Fall, wo, wie gesagt, die Farbeschwankungen des Parasiten so ausgesprochen sein können, ein absoluter Zusammenhang zwischen einer gewissen Farbe und dem Grad oder der Natur der Giftigkeit angenommen werden muß; zumal weil, wie gesagt, von uns selbst festgestellt wurde, daß dieser

Zusammenhang kein konstanter ist. Ich erlaubte mir, auf diese Erscheinungen aufmerksam zu machen wegen der großen Analogie, die sie mit den von mir für einige Penicillienformen beschriebenen aufweisen; das läßt vermuten, daß sie sowohl in dem einen, wie in dem anderen Falle sehr wahrscheinlich auf dieselbe Weise gedeutet werden müssen.

Was auch die Ursache sein mag, die auf diese häufiger und tiefgehenden Schwankungen im Stoffwechsel des hier beschriebenen Aspergillus einwirken kann, so sei bemerkt, daß dieser Pilz vom pathogenen Gesichtspunkt aus als mit vorwiegend deprimierenden toxischen Eigenschaften begabt zu betrachten ist; da die erregungs- und krämpfeerzeugenden toxischen Substanzen nur in den im Juni und Juli und anfangs September gewachsenen Kulturen wahrgenommen wurden; während die in allen übrigen Jahresmonaten gewachsenen Pilze immer deprimierende und lähmende toxische Substanzen lieferten.

Daraus folgt, daß dieser neue Aspergillus, vom pathogenetischen Gesichtspunkt der Pellagra aus, mehr für einen Faktor zur Entstehung der chronisch verlaufenden Formen, die mit Depressionserscheinungen einhergehen, angesehen werden muß, während er für die akuten, mit Erregungserscheinungen einhergehenden Formen, weniger in Betracht kommt.

Das Wesen der von jenen Unglücklichen gezeigten Erkrankungssymptome die jenes ungesunde Haus bewohnten und bewohnen, aus welchen der beschriebene Parasit in erheblicher Menge isoliert wurde, ist leider, so glaube ich, auch diesmal die beredteste Bestätigung dieses Schlusses, zu dem wir auf Grund der oben mitgeteilten Untersuchungen gelangt sind.

---

Hier folgen nun die Schlußfolgerungen, die, wie ich glaube, aus den gewonnenen Ergebnissen gezogen werden dürfen.

1. Die hier beschriebene Art von Aspergillus varians wurde bis jetzt ausschließlich auf dem hohen Apenningebirge von Reggio (Emilia) vorgefunden. Der Parasit wurde aus der Luft einer ungesunden und seit einigen Jahren von einer mit chronischer Pellagra behafteten Familie bewohnten Hütte isoliert.

2. Dieser Parasit entwickelt sich im Winter bei Umgebungstemperatur nicht, und in dieser Jahreszeit auch im Brutofen bei seinem Temperaturoptimum schlecht. Er entwickelt sich hingegen gut und rasch bei Umgebungstemperatur im Frühjahr, Sommer und in einem Teil des Herbstes.

3. Die typischen morphologischen Merkmale dieses Parasiten erhalten sich unverändert während jeder Jahreszeit, dagegen wechseln erheblich das makroskopische Aussehen der Kultur und noch mehr die Farbe des Rasens, selbst nach sehr kurzen Zeitabständen, während des jährlichen Lebenszyklus desselben Parasiten. Im Winter herrscht die rötliche und die okergelbe Farbe vor; im Frühjahr und Sommer das

Grüne mit seinen verschiedenen Nuancen, während im Herbst die blaßgrüne und die karminrote Farbe vorwiegt.

4. Dieser Hyphomycet ist pathogen. Er vermag spezifische toxische Substanzen zu erzeugen, die jedoch in ihrem Grad nach den verschiedenen Jahresperioden erheblich variieren.

a) Die Perioden von größter Giftigkeit fallen mit Frühjahr und Herbst zusammen; während dieser Perioden ist der pathogene Vermögensgrad des Parasiten sehr hoch, indem er selbst jene des Aspergillus fumigatus überlegen sein kann.

b) Die Perioden geringster Giftigkeit fallen gewöhnlich mit Winter und Sommer zusammen; während dieser Jahreszeiten kann der Grad des toxischen Vermögens so hinuntersteigen, daß man den Parasit als unschädlich betrachten kann.

5. Die vom Pilze erzeugten toxischen Substanzen können ferner auch von verschiedener und entgegengesetzter Natur nach den der verschiedenen Jahresperioden sein; einmal sind in der Tat die toxischen Substanzen von deprimierender und paralysierender Natur, ein anderes Mal hingegen von erregender, krämpfeerzeugender Natur. Die toxischen Substanzen deprimierender und lähmender Natur überwiegen jedoch diejenigen erregender und krämpfeerzeugender Natur; denn während diese letzteren bloß in einigen Perioden des Sommers und des Herbstes gefunden wurden, sind die ersteren in jeder Jahreszeit vorhanden.

6. Der Grad und die Natur der toxischen Substanzen stehen in keinerlei Beziehung zu dem Nährboden, auf dem sich der Pilz entwickelt, sondern hängen mit den äußeren Bedingungen der Umgebung zusammen, in der sich der Pilz entwickelt.

7. Die toxischen Substanzen sind immer durch die gewöhnlichen Extraktionsmittel isolierbar und haben keine Beziehung zu Phenolverbindungen.

8. Dieser Parasit kann wegen des Grades und der Natur seiner toxischen Substanzen in ursächlichen Zusammenhang sowohl mit den chronisch verlaufenden, wie mit den akuten Pellagraformen gesetzt werden.

Unter den Bedingungen unseres Klimas beansprucht er jedoch eine größere Bedeutung für die chronischen Formen als für die akuten.

---

## Literaturverzeichnis.

Ceni, Gli Aspergilli nella etiologia e patogenesi della pellagra, Riv. sper. di Freniatria Vol. 28 1902.

Ceni e Besta, Principii fossiei degli Aspergilli fumigatus e flavescens e loro rapporti colla pellagra I., Ebenda.

—, Über die Toxine von Aspergillus fumigatus und Aspergillus flavescens und deren Beziehungen zur Pellagra, Centralbl. f. path. Anat. Bd. 13 1902.

Ceni, Nuove ricerche sullo sviluppo degli Aspergilli in rapporto colla diffusione della pellagra, Riv. sperm. di Freniatria Vol. 29 1903.
—, Über die Lokalisation der Aspergillussporen in den Mesenterialdrüsen der Pellagrakranken, Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. Bd. 14 1903.
—, Localizzazione delle spore aspergillari nelle ghiandole mesenteriche dei pellagrosi e loro consecutiva attenuazione, Riv. sper. di Freniatria Vol. 29 1903.
—, Sulle proprietà patogene del Penicillum glaucum nell' etiologia della pellagra, Ebenda.
Ceni e Besta, I penicilli nell' etiologia e patogenesi della pellagra, Ebenda.
Ceni, Le proprietà tossiche dell' Aspergillus fumigatus in rapporto colle stagioni dell' anno, Ziegler's Beiträge z. path. Anat. u. allg. Path. Bd. 35 1903. Siehe auch: Riv. sper. di Freniatria Vol. 30 1904.
Ceni e Besta, Die pathogenen Eigenschaften des Aspergillus niger mit Bezug auf die Genese der Pellagra, Centralbl. f. allg. Path. u. path. Anat. 1905. Siehe auch: Riv. sper. di Freniatria Vol. 30 1904.
Ceni, Le proprietà tossiche di alcuni i fomiceti in rapporto colle stagioni e col cielo annuale dell' endemia pellagrosa, Riv. pellagrologica Nr. 6 1904.
—, Le proprietà patogene dell' Aspergillus ochraceus in rapporto colle genesi della pellagra, Riv. sper. di Freniatria Vol. 31 Fasc. I—II 1905.
—, Di alcuni caratteri biologiei dei penicilli in rapporto colle stagioni e col cielo annuale della pellagra, Seconda nota preventiva, Atti del Congresso di Patologia generale, Roma Aprile 1905. Siehe: Riv. pellagrologica Nr. 4 1905.
—, Nuovi concetti nell' etiologia e cura della pellegra, Giorn. d. R. Società d'Igiene Italiana 1905.

---

## Erklärung der Abbildungen.

### Tafel V.

Fig. 1. Im Dezember 1904 bei 22 ° C. im Brutofen auf Raulin'scher Flüssigkeit innerhalb 26 Tagen gewachsener Kulturrasen.

Fig. 2. Im Januar 1905 im Ofen bei 22 ° C. innerhalb 26 Tagen gewachsener Kulturrasen.

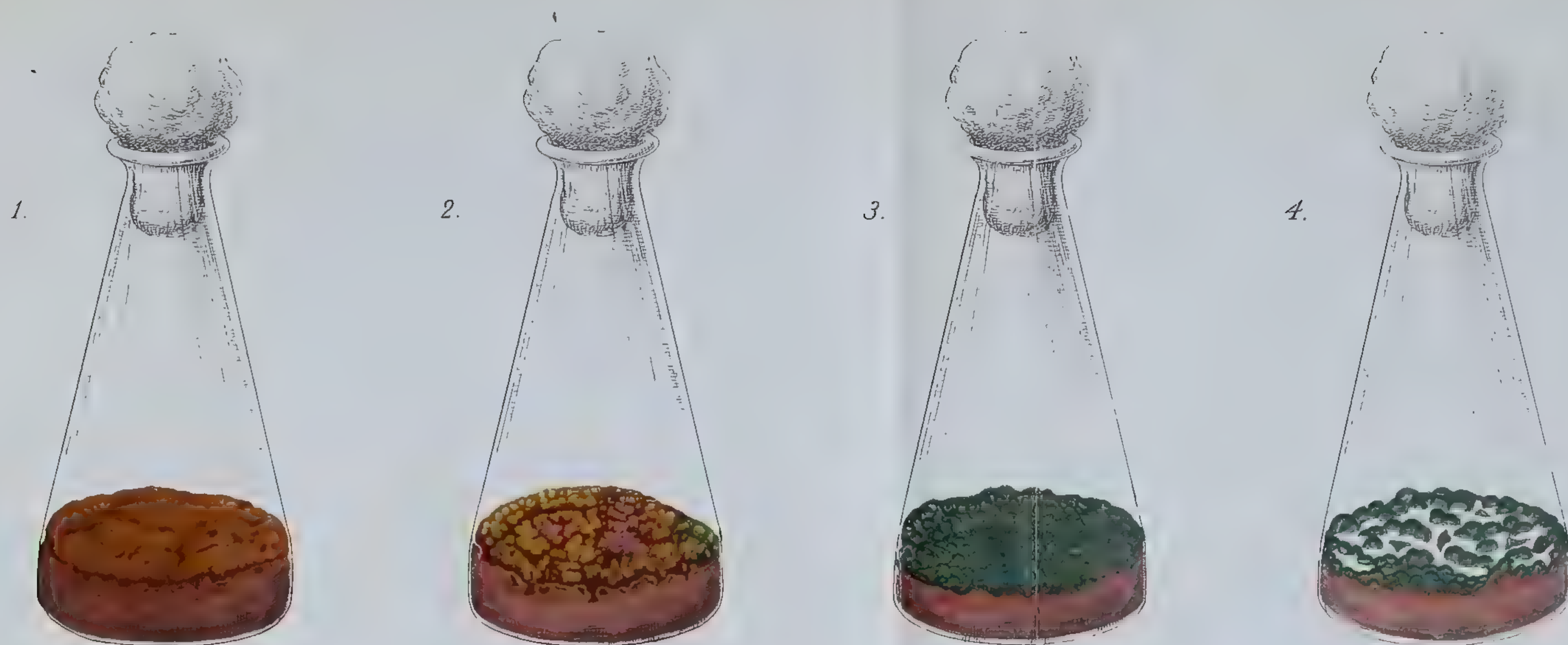
Fig. 3. Im März 1905 im Ofen gewachsene, 18 Tage alter Kulturrasen. Ähnlich aussehende Kulturrasen wurden auch bei Umgebungstemperatur im Mai 1905 erhalten.

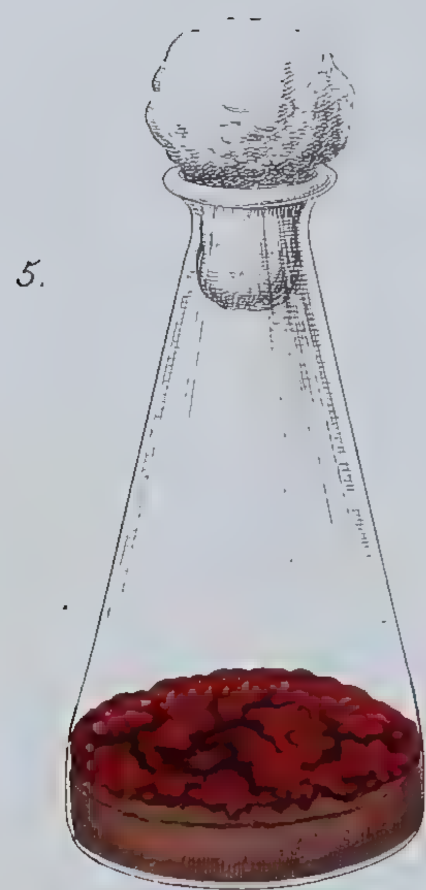
Fig. 4. 11 Tage alter, im Mai 1905 bei Umgebungstemperatur gewachsener Kulturrasen. Ähnlich aussehende Kulturrasen wurden während des ganzen Frühjahrs, Sommers und seltener im Herbst erhalten.

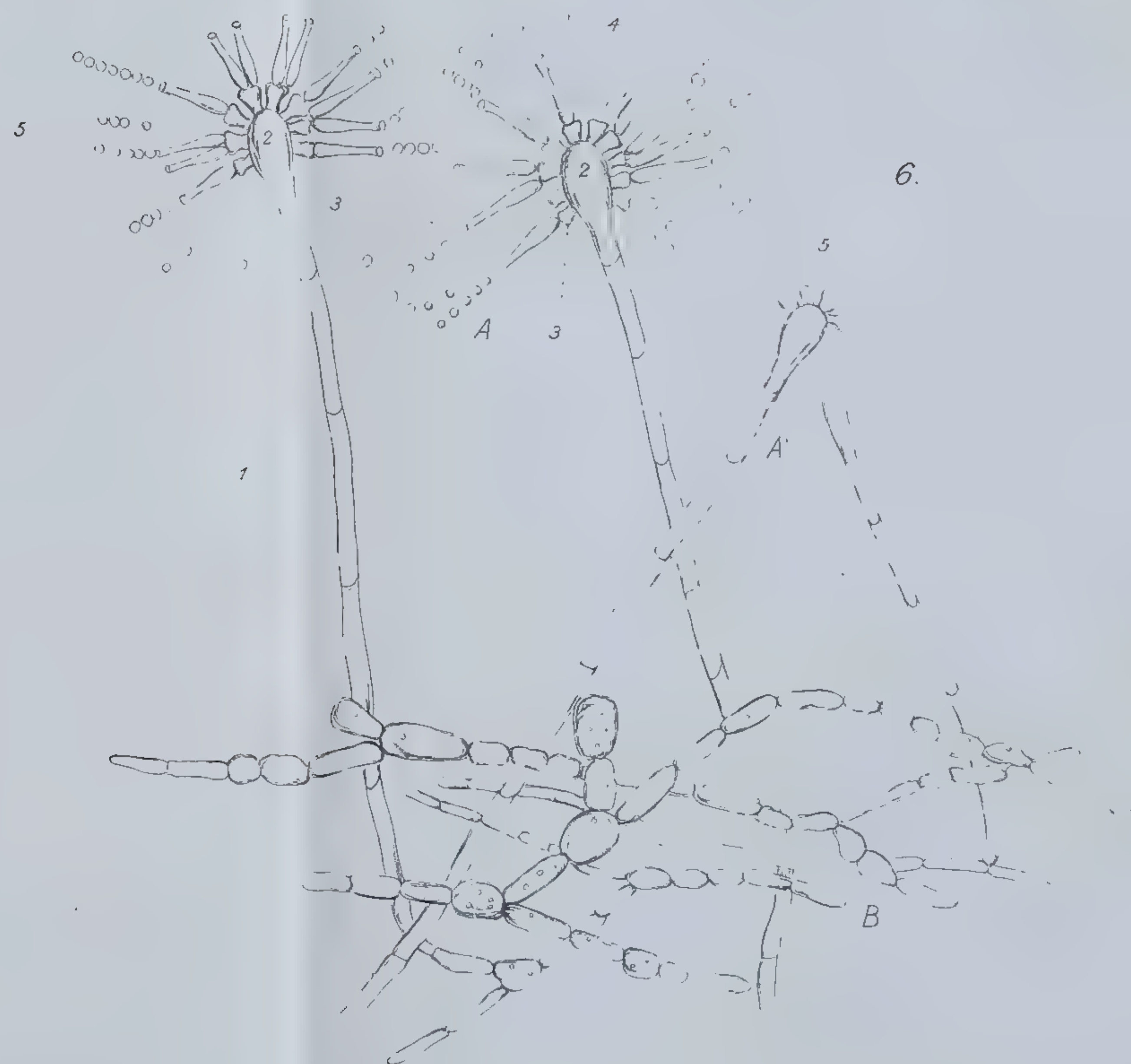
Fig. 5. 10 Tage alter, bei Umgebungstemperatur während der letzten Tage vom August und der ersten vom September 1905 gewachsene Kulturrasen. So gefärbte Kulturrasen wurden nur in dieser Zeitperiode erhalten.

Fig. 6. Parasit bei 475 Durchm. Vergrößerung. *A* Ausgebildeter konidientragender Apparat, *A'* sich bildender konidientragender Apparat, 1. fruchttragender Faden, 2. Endbläschen, 3. primäres Sterigma, 4. sekundäres Sterigma, 5. Sporen.

NB. Die Fig. 1 auf der Tafel ist Fig. 2 im Texte, und umgekehrt.




NI - Aspergillus Varians - Pellagra

Verlag von Gustav Fischer in Jena

Lit. A Dal Re & C. Modena



Lippert & Co. (G. Pätz'sche Buchdr.), Naumburg a. S.




Dott. CARLO CENI

Direttore dei Laboratorj scientifici dell' Istituto Psichiatrico di Reggio Emilia

# SULLA REAZIONE FENOLICA

## IN RAPPORTO

## COI TOSSICI PELLAGROGENI



UDINE

TIPOGRAFIA D. DEL BIANCO

1906

Dott. CARLO CENI
Direttore dei Laboratorj scientifici dell' Istituto Psichiatrico di Reggio Emilia

# SULLA REAZIONE FENOLICA

## IN RAPPORTO

# COI TOSSICI PELLAGROGENI



UDINE
TIPOGRAFIA D. DEL BIANCO
1906

Estratto dalla *Rivista Pellagrologica Italiana*



In un numero recente di questa « Rivista » il Gosio (1), dopo aver esposto a un di presso il concetto del Di Pietro sulla natura glucosidica dei tossici pellagrogeni e ch' egli pure oggi tenderebbe ad ammettere, accettando ormai il concetto nostro e del Di Pietro che essi sono degli elementi costitutivi del parassita e non già dei prodotti di trasformazione del substrato nutritivo, com' egli prima credeva, porta la discussione sul valore che ora si può attribuire ai noti *fenoli* sia nella formazione dei tossici stessi, sia come dato diagnostico di sostanze alimentari infette.

Il Di Pietro (2) negando a questi fenoli qualsiasi valore nella costituzione del tossico pellagrogeno, li considera come un carattere differenziale della varietà tossica di *Penicillum Glaucum* da lui studiata. Egli sarebbe poi arrivato anche all' isolamento e alla separazione dei due principii, cioè, del tossico e dell' acido aromatico che reagisce al cloruro ferrico. Il Gosio invece, limitando alquanto

---

(1) *La reazione fenolica del granoturco in rapporto coi parassiti vegetali.* Questa Rivista. Anno VI, N. 1. 1906.

(2) *Studio morfologico e biologico sul Penicillum Glaucum.* Teramo. Tipografia Centrale 1904.

il valore da lui prima dato ai composti fenolici nella etiologia della pellagra, vorrebbe ora dar loro il significato *di un indice esplicativo del meccanismo di tossicità.* Secondo lui questi composti fenolici servirebbero a fissare i principii tossici specifici che sono elaborati entro il parassita stesso; di modo che gli uni sarebbero intimamente legati agli altri.

Ed è in base a questo concetto che ripugnando al Gosio di ammettere l'esistenza dei principii tossici senza la presenza dei fenoli, si scaglia contro di me e contro il mio collaboratore Dr. Besta, incolpandoci di incompetenza e d'altro perchè negli estratti alcoolici delle varie specie di Aspergilli da noi fin qui studiate non abbiamo mai potuto constatare alcun rapporto tra i principii tossici e i suddetti composti fenolici che reagiscono al cloruro di ferro.

Egli ci rimprovera acerbamente perchè in questi casi negativi ci siamo limitati alla classica reazione da lui proposta e non abbiamo esperiti tutti quei metodi di ricerche scientifiche, com'egli chiama, « rigorose e di primo ordine », che sarebbero necessarie per accertarsi se esistano o no degli altri composti fenolici che non reagiscano al cloruro di ferro.

E in realtà, per quanto sia ammissibile l'attuale ipotesi del Gosio, che oltre ai suoi composti fenolici ne possano esistere altri ancora che non reagiscono al cloruro di ferro, ma che pure abbiano la proprietà di fissare i tossici specifici, ci meraviglia anzitutto com'egli stesso, colla competenza che si arroga in materia, non abbia ritenuto opportuno approfondire di persona l'argomento e lo pretenda invece da altri ch'egli poi dichiara incompetenti.

In secondo luogo le sue invettive ci sembrano tutt'altro che giustificate; perchè nelle nostre pubblicazioni, accennando ai suddetti composti fenolici abbiamo sempre voluto limitarci a quelli messi in evidenza da lui; come hanno fatto del resto finora tutti quelli che si occuparono di questa questione. Basti ricordare la nostra prima pubblicazione sui Penicilli col dott. Besta, nella quale perfino nelle conclusioni generali abbiamo creduto opportuno di far rilevare questo nostro intento, e dove si legge ripetutamente «i principii tossici non hanno rapporto coi composti fenolici del Gosio», per convincersi come il Gosio ha forse mal interpretato i nostri giudizi ch'egli chiama *gratuiti*.

Se poi in seguito non si è voluto sempre specificare che noi intendevamo riferirci ai fenoli del Gosio, fu solo perchè ormai lo si credeva inutile, essendo convinti che per tutti i pellagrologi il nome di *composti fenolici* valesse a indicare quelli del Gosio, come i soli fin qui dimostrati. Noi eravamo d'altronde sicuri che nessuno avrebbe voluto intravedere in queste parole una ben che lontana allusione a principii chimici che per ora rimangono solo nel campo delle nuove ipotesi del Gosio stesso.

Le discrepanze che esistono tra i nostri reperti e quelli del Gosio sui composti fenolici in rapporto coi tossici pellegrogeni riguardano infatti esperienze eseguite col medesimo metodo di tecnica e spesso anche sulla medesima specie di parassiti; per cui invece di suscitare polemiche in questo caso troviamo che nell'interesse della scienza e pel bene dell'umanità, si dovrebbe indagare dove risiede la causa dell'eventuale errore che farebbe giungere, seguendo uno stesso metodo, a risultati diversi ed opposti.

Il Gosio in opposizione ai nostri risultati negativi sugli Aspergilli, e in modo speciale sull'*Aspergillus Varians* e sul *Flavescens*, dichiara che nelle sue mani queste due specie di ifomiceti danno invece la tipica reazione al cloruro di ferro.

A proposito dell'*Aspergillus Varians* mi limito solo a far osservare che la specie da me descritta e su cui io sperimento ormai da circa due anni sempre cogli stessi risultati negativi, non si deve confondere coll'Asp. *Varians Wehmer*, come invece il Gosio nella sua nota cerca di far credere e sulla quale egli pare abbia sperimentato (1).

Ho ripetuto le esperienze anche sulla specie di Asp. *Varians Wehmer* e ch'io debbo alla cortesia del dott. Tiraboschi, collaboratore del Gosio; ma finora debbo pure confessare che anche questo non mi diede mai tracce di reazione al cloruro di ferro. È però qui mio dovere far conoscere a tale proposito che il dott. Tiraboschi inviandomi l'Asp. *Varians Wehmer* mi avvertiva che il germe speditomi non era quello da lui descritto (2) e che nelle mani del Gosio aveva dato la reazione tipica al cloruro di ferro. Questo per uno scambio d'etichette, com'egli scrivevami, era stato disgraziatamente smarrito, e quello inviatomi, per quanto analogo, presentava alcuni caratteri colturali diversi del primo.

Anche i risultati di queste ricerche di controllo

---

(1) Che il mio *Aspergillus Varians* costituisca una specie nuova e assai diversa dall'Asp. *Varians Wehmer* fu provato anche recentemente dal dott. Tiraboschi, assistente ai Laboratorj della Sanità Pubblica in Roma, come risulta da due sue pregiate lettere in data del 12-2-06 e dell' 8-3-06.

(2) *Sopra alcuni ifomiceti del mais guasto ecc.* « Annali di Botanica ». Vol. II. Fasc. I.

sull'Asp. *Varians Wehmer* non possono avere perciò che un valore molto relativo, potendosi trattare di specie o varietà diverse del germe. Il Gosio che invece ha la fortuna di aver a sua disposizione il germe genuino da me descritto, potrà eseguire delle vere ricerche di controllo, e io faccio fin d'ora affidamento sulla sua serietà perchè possa convincersi che i nostri giudizii sono esclusivamente fondati sulla realtà dei fatti.

Inesplicabili sono invece, per ora almeno, i risultati diversi ed opposti ottenuti da me e dal Gosio sull'*Aspergillus Flavescens*, che nelle mani mie e del dott. Besta non diede mai, nel periodo di oltre tre anni, la minima traccia di reazione al cloruro di ferro anche sperimentando su quantità notevolissima di materiale (1); mentre in quelle del Gosio avrebbe pure dato « in grande copia composti tipici nel modo di reagire còl cloruro ferrico ecc. ».

Dico inesplicabile, perchè in questo caso i risultati diversi ed opposti furono ottenuti sperimentando sopra la medesima specie di ifomiceto, come potei di recente convincermi dietro opportuni raffronti tra il germe che servì per le mie ricerche e quello che servì al Gosio e ch'io debbo pure alla cortesia del dott. Tiraboschi.

Ho ripetuto del resto nell'aprile scorso le ri-

(1) Intendo qui riferirmi all'*Aspergillus Flavescens* che io ho studiato prima da solo (Gli Aspergilli nell'etiologia della pellagra ecc. « Riv. sper. di Freniatria » 1901) e poi col Besta (Veleni degli Aspergilli *Fumigatus* e *Flavescens* ecc. Id. 1902) e che il Tiraboschi nella sua memoria sopra citata si crede autorizzato di ammettere che fu da me confuso coll'*Aspergillus Glaucus*, pel fatto che da lui non fu rinvenuto in alcuni campioni di farina di mais proveniente da luoghi pellagrosi.

cerche dei fenoli anche sull'Asp. *Flavescens* proveniente dal Laboratorio del Gosio stesso, ma i risultati furono sempre negativi.

Ciò premesso, voglio ora in breve riassumere i fatti più importanti emersi dalle mie ricerche sulla classica reazione fenolica nel *Penicillum Glaucum;* i quali se non potranno spiegare tutte le controversie intorno a questo argomento, varranno però certo sempre più a dimostrare come il rapporto tra i composti fenolici del Gosio e i principii tossici pellagrogeni sia tutt'altro che costante anche in questa specie di ifomiceti, che sembra oggi costituire oggetto di studio prediletto degli sperimentatori.

Mi riferisco a ricerche eseguite sopra 61 campioni di Penicilli verdi, molti dei quali, come già dissi anche altrove, corrispondono a varietà botaniche ben definite. Le ricerche dei fenoli classici furono fatte sempre comparativamente a quelle del potere tossico dei parassiti e ripetute metodicamente nelle varie stagioni di oltre due anni consecutivi. Siccome però sulle proprietà tossiche ebbi già a dire abbastanza per esteso in una nota recente (1); così qui mi accontento di accennare solo a questa parte facendo di essa risaltare i punti più importanti e che hanno rapporto diretto coi risultati della reazione al cloruro di ferro.

Anzi tutto debbo far notare che nel mio lungo periodo di osservazione sui Penicilli ai quali mi riferisco (dal Gennaio 1904 all'Aprile 1906), mentre tutti questi ora in un'epoca, ora nell'altra presentarono delle fasi più o meno lunghe di at-

(1) *Sul ciclo biologico dei Penicilli verdi in rapporto con l'endemia pellagrosa.* « Riv. sper. di Freniatria. » Fasc. I-II, 1906.

tività tossica; di modo che noi siamo ora obbligati a ritenere assai probabilmente, come già dissi nella suddetta pubblicazione, patogene tutte le diverse varietà di questa specie di ifomiceti; solo una parte di essi invece apparve dotata della proprietà di reagire al cloruro di ferro.

Di questi 61 campioni patogeni, solo 37 presentarono infatti, nei varj periodi di osservazione, la proprietà di dare la classica reazione fenolica; mentre gli altri 24 campioni pure patogeni, ripeto, in nessuna epoca di osservazione reagirono al cloruro di ferro, per quanto la ricerca venisse sempre eseguita sopra una quantità considerevole di materiale. Da ciò appare quindi fin d' ora incontestabile che la classica reazione fenolica non può essere considerata nè come un carattere differenziale di varietà tossiche di Penicilli verdi, secondo il concetto del Di Pietro, nè tanto meno può essere considerata come indice esplicativo del meccanismo del potere tossico di questi ifomiceti, secondo il nuovo concetto del Gosio.

Ecco pertanto un po' più dettagliatamente i rapporti tra il potere tossico e il potere di reagire al cloruro di ferro riscontrati in queste mie ricerche.

Premetto anzitutto che oggi, non ostante un periodo di osservazione di oltre due anni, sarebbe una pretesa troppo azzardata il voler parlare, in base ai risultati suddetti, di una vera distinzione di *Penicilli fenolici* e *Penicilli afenolici;* giacchè non farebbe meraviglia che da un periodo di osservazione più prolungato risultasse invece che tutte le varietà di questa specie di ifomiceti sono capaci di dare la suddetta reazione, nello stesso modo che oggi dobbiamo ritenere queste varietà

botaniche tutte patogene. I dati anzi che noi possediamo in proposito, ci porterebbero fin d'ora ad ammettere che con grandissima probabilità la proprietà di reagire al cloruro di ferro non costituisce altro che un carattere inerente a fasi biologiche speciali di questi ifomiceti, più o meno indipendenti dalle fasi di attività tossica da noi descritte. Ciò sembrami poter dedurre dal fatto che mentre alcuni dei Penicilli della nostra collezione hanno presentato la proprietà di reagire al cloruro ferrico in grado più o meno intenso in tutto il periodo di osservazione; altri invece hanno presentato queste proprietà in modo intermittente e soltanto in epoche ben determinate, intercalate da fasi più o meno lunghe di completa inattività. Così si ebbero ad osservare ancora dei Penicilli che avendo dato la reazione fenolica fin dal primo momento in cui furono isolati, perdettero poi in seguito completamente questa proprietà dopo un periodo più o meno lungo di 6-14 mesi e più, pur conservando molte volte inalterata la proprietà tossica; mentre si ebbero a osservare altri Penicilli che dopo un lungo periodo di un anno e più di assenza completa dei suddetti fenoli, entrarono in seguito in una seconda fase di più mesi di fila, durante la quale reagirono nel modo più tipico al cloruro di ferro.

Ad ogni modo attendo i risultati di osservazioni più prolungate e più complete, prima di pronunciarmi in modo definitivo su questa questione, prima, cioè, di concludere se realmente trattasi di fasi biologiche speciali caratterizzate dalla reazione fenolica classica, o se invece si tratta di un carattere differenziale delle diverse varietà di Penicilli.

Più che sufficienti credo che siano invece i dati

che posseggo per poter concludere sui rapporti tra la proprietà di reagire al cloruro di ferro e quella di elaborare dei tossici specifici. Già ho accennato più sopra come pei Penicilli che durante il periodo di osservazione presentarono a intermittenza la proprietà di reagire al cloruro di ferro, tale rapporto sia apparso tutt'altro che costante: Penicilli che nella fase fenolica erano apparsi tossici, continuarono ad esserlo non di raro anche durante la fase afenolica successiva; come Penicilli che erano tossici durante una prima fase afenolica, diventarono poi innocui durante una fase fenolica successiva. Non sempre però ho notato questa mancanza di rapporti tra potere tossico e potere di reagire al cloruro di ferro. In molti casi, in particolar modo in quelli che rimasero fenolici per tutto il periodo di osservazione, debbo anzi dire di aver constatato un vero rapporto diretto tra il grado della reazione fenolica e quello del potere tossico. Posseggo infatti campioni di Penicilli in cui questo rapporto diretto si mantenne costante nelle varie stagioni da oltre due anni; di modo che ad una fase di tossicità massima corrispose sempre una reazione intensa e tipica, e viceversa a una fase di tossicità minima corrispose sempre una reazione assai debole e spesso appena percettibile.

Questi casi in cui la reazione al cloruro di ferro si potrebbe considerare come un vero indice del grado di tossicità, sono però troppo rari per trarne delle deduzioni generali; mentre ad essi si possono contrapporre degli altri casi i quali vengono a dimostrare che il suddetto rapporto diretto quando esiste non può esser considerato assai probabilmente che come una semplice coincidenza di due

fenomeni biologici diversi. Esistono infatti dei Penicilli nella mia collezione che si sono mantenuti dotati della proprietà di reagire in modo tipico al cloruro di ferro in tutto il periodo di osservazione, con deboli varianti relative alle diverse stagioni, ma che invece si mantennero innocui nella massima parte di questo periodo. Conservo poi, infine, altri Penicilli il di cui grado di tossicità si è presentato non di raro in rapporto inverso coll' intensità della reazione classica.

È logico concludere dopo tutto questo che i principii fenolici che reagiscono al cloruro di ferro, non hanno e non possono avere alcun valore nè come indice di tossicità dei Penicilli e tanto meno ancora come indice esplicativo del meccanismo della tossicità, come pretenderebbe il Gosio; giacchè manca ogni rapporto costante tra il potere tossico e la suddetta reazione. Non ci resta quindi che di ammettere col Di Pietro la presenza di due principii diversi e indipendenti fra di loro nel medesimo parassita; nello stesso modo, p. es., che nell' *Amanita bulbosa* può contemporaneamente esistere tanto un principio alcoloide, quanto una toxi-albumina, come ha dimostrato *Kobert* (Rev. Mycologique, N. 89; 1901).

Il Di Pietro del resto, come già dissi più sopra, già sarebbe arrivato direttamente a questa dimostrazione per la varietà tossica di *Penicillum Glaucum* da lui descritta, avendo potuto egli isolare separatamente il principio tossico dall' acido aromatico che reagisce al cloruro di ferro.

Le esperienze del Di Pietro furono poi ripetute nel nostro Laboratorio ed ebbero la piena riconferma, come vedremo meglio a suo tempo riferendo i risultati da noi ottenuti, anche con me-

todi diversi, sulla separazione dei tossici pellagrogeni dai principii fenolici.

Voglio accennare invece qui ancora ai vari rapporti da me osservati tra i principii fenolici che reagiscono al cloruro ferrico e la diversa natura dei principii tossici pellagrogeni.

Già nell' ultima mia memoria sopra ricordata « *sul ciclo biologico dei Penicilli ecc.* » facevo notare come anche questi ifomiceti non possono più esser divisi dal punto di vista della natura fisiologica dei tossici da loro elaborati, cioè, non possono oggi più esser divisi in Penicilli a tossici *eccitanti e convulsivanti* e in Penicilli a tossici *deprimenti e paralizzanti*, come sembrava possibile dalle nostre prime osservazioni in proposito; giacchè è risultato in seguito evidente che la diversa natura dei tossici non è legata a varietà speciali di questi parassiti, ma è bensì legata a fasi biologiche dei medesimi. Tutti i Penicilli da me studiati infatti, come l'*Aspergillus Varians* da me descritto, durante il periodo di osservazione si presentarono capaci di elaborare, indipendentemente dal mezzo nutritivo, ora dei tossici eccitanti e convulsivanti, ora dei tossici deprimenti e paralizzanti in modo alternativo, seguendo probabilmente una legge biologica a noi sconosciuta.

Dovendo perciò ora parlare di rapporti tra la classica reazione fenolica e la natura dei principii tossici pellagrogeni, dovremo noi sempre tener presente questo fatto, vale a dire, ripeto, che la diversa natura dei tossici non riguarda specie o varietà di parassiti diversi, ma riguarda solamente alcune fasi biologiche dei medesimi.

Tralascio anche qui di descrivere tutti i particolari dei rapporti suddetti perchè andrei troppo

per le lunghe; molto più che mi propongo di ritornare sull'argomento e con un maggior numero di osservazioni, quando esporrò i risultati definitivi dei miei studi sul ciclo biologico di questa specie di ifomiceti. Mi limito perciò ancora ad accennare per brevi capi ai fatti più salienti, bastando essi per darci un concetto esatto di questa questione tanto complessa.

Stando sempre alle nostre osservazioni, notiamo anzitutto che la reazione fenolica in discorso coincide nei Penicilli con una sorprendente prevalenza colle fasi in cui il parassita elabora dei tossici a carattere *eccitante* e *convulsivante*; di modo che in alcuni casi il rapporto tra questi due fenomeni è così spiccato e diretto che tale reazione si potrebbe considerare in realtà quale un esponente del grado di tossicità. La reazione è quivi di solito infatti più intensa nei periodi di attività tossica massima e lieve o quasi nulla nei periodi di attività tossica minima.

Questo rapporto per quanto frequente, è però ben lungi dall'essere costante e dal costituire una legge. Al contrario non di raro abbiamo osservato una reazione fenolica intensa anche in casi in cui il parassita era dotato di potere tossico eccitante assai lieve o nullo; come abbiamo anche osservato non di raro il fatto inverso, cioè, una reazione fenolica debole o nulla, in casi in cui il potere tossico suddetto appariva coi caratteri più gravi e più tipici che mai si potessero immaginare.

I rapporti quindi tra i principii tossici di carattere eccitante e convulsivante e la reazione fenolica, per quanto frequenti, sono tutt'altro che costanti e sono ben lungi perciò dal permetterci qualsiasi deduzione d'indole generale anche sul

valore che essi possono avere nella costituzione intima degli stessi tossici pellagrogeni.

Ancor meno costanti sono apparsi i rapporti della suddetta reazione colle fasi di attività tossica a carattere deprimente e paralizzante. Di solito quando gli estratti penicillari agivano sugli animali con fenomeni deprimenti e paralizzanti mancava in essi ogni traccia della tipica reazione al cloruro di ferro. Anche questo fatto è però ben lungi dal costituire la regola, perchè non di raro ho potuto osservare la reazione classica anche in Penicilli a tossici deprimenti e paralizzanti. Un rapporto costante tra il carattere fisiologico del tossico e la reazione fenolica non esiste quindi in alcun modo.

Non è mia intenzione di indagare qui le cause dei fenomeni sopra esposti, e mi limito perciò alla constatazione dei fatti contro i quali è superflua per ora ogni critica ed ogni obbiezione.

Riassumendo perciò quanto fu osservato da me e dal mio collaboratore dott. Besta sulla reazione fenolica classica nelle varie specie di ifomiceti patogeni, dirò:

1. Nessuno degli Aspergilli da noi studiati (*Aspergillus Fumigatus*, *A. Niger*, *A. Ochraceus*, *A. Flavescens*, *A. Varians*) sperimentati nelle loro varie fasi biologiche tossiche e atossiche, si presentarono capaci di reagire al cloruro ferrico.

2. Di 61 campioni di Penicilli verdi, tutti patogeni, fin qui studiati e sperimentati metodicamente nelle varie stagioni per oltre due anni di fila, 37 reagirono ora in un'epoca ora nell'altra, ma sempre in modo tipico, al cloruro ferrico; mentre gli altri 24 campioni non diedero mai luogo ad alcuna traccia di questa reazione, pur presentando pro-

prietà tossiche eccitanti e deprimenti eguali a quelle dei primi.

3. La classica reazione fenolica fu riscontrata con notevole preferenza in rapporto col potere tossico *eccitante* e *convulsivante* dei Penicilli verdi; più di raro assai fu osservata in rapporto col potere tossico *deprimente* e *parilizzante* dei medesimi parassiti.

4. La reazione fenolica fu spesso trovata in rapporto diretto col grado di tossicità, specialmente nei Penicilli con tossici di natura *eccitante* e *convulsivante;* più di raro invece fu riscontrata in rapporto inverso col grado di tossicità dei medesimi parassiti.

5. La tipica reazione al cloruro di ferro fu osservata non di raro nei Penicilli verdi anche durante delle fasi più o meno lunghe (di un anno e più) in cui questi si erano mantenuti del tutto innocui, incapaci, cioè, di elaborare dei tossici di qualsiasi natura.

*Reggio Emilia, 4 maggio 1906.*

---



RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXII. FASC. I.-II.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SUL CICLO BIOLOGICO DEI PENICILLI VERDI

## IN RAPPORTO COLL' ENDEMIA PELLAGROSA

e con speciale riguardo alla loro attività tossica nelle varie stagioni dell'anno



III.ª NOTA

DEL

Dott. CARLO CENI
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1906.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: **A. TAMBURINI**
VOL. XXXII. FASC. I.-II.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SUL CICLO BIOLOGICO DEI PENICILLI VERDI

## IN RAPPORTO COLL' ENDEMIA PELLAGROSA

## e con speciale riguardo alla loro attività tossica nelle varie stagioni dell'anno



**III.ª NOTA**

DEL

Dott. CARLO CENI
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1906.



*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*



Tre anni or sono, pubblicando i risultati delle mie prime ricerche col D.r Besta sul valore patogeno dei Penicilli, dimostravo come anche questa specie di ifomiceti, analogamente agli Aspergilli, possa essere dotata di proprietà tossiche diverse ed opposte. Descrivevo infatti allora due varietà botaniche di *Penicillum Glaucum,* una capace di elaborare dei tossici di natura paralizzante e deprimente, e l' altra capace di elaborare invece dei tossici di natura eccitante e convulsivante, e richiamavo ancora l' attenzione sull' importanza di questo fatto nell' interpretazione etiologica delle varie forme cliniche della pellagra.

In seguito, in due comunicazioni successive fatte nel 1904-905, una al XII.° Congresso Freniatrico in Genova e l' altra al III.° Congresso della Società Italiana di Patologia in Roma, esponendo i risultati delle mie ulteriori ricerche, affermavo, in base a esperienze metodiche eseguite per circa due anni di seguito sopra oltre 60 campioni di Penicilli verdi e corrispondenti in gran parte ad altrettante varietà botaniche, che moltissimi di questi parassiti erano da considerarsi patogeni, dotati, cioè, di proprietà tossiche convulsivanti o deprimenti; mentre assai più limitato era il numero di quelli che si potevano chiamare innocui, cioè sprovvisti di ogni proprietà patogena.

In queste note preventive facevo però già osservare che il grado di tossicità dei tipi risultati patogeni era tutt' altro che

eguale e costante; giacchè non solo variava notevolmente da varietà a varietà, ma nelle singole varietà stesse variava ancora, e in modo assai accentuato, nei diversi periodi dell'anno. Il massimo grado di tossicità era raggiunto di solito da questi parassiti durante le stagioni calde in genere e più specialmente nella primavera; mentre durante le stagioni fredde questa proprietà di fabbricare dei tossici andava diminuendo assai, e in alcuni casi finiva per scomparire del tutto, non ostante che il mezzo di coltura fosse sempre rimasto il medesimo, e non ostante che questi ifomiceti venissero messi a sviluppare anche a una temperatura corrispondente al loro *optimum*.

Il rapporto tra il potere tossico dei parassiti in discorso e le varie epoche dell' anno corrispondeva quindi a un dipresso a quello che già avea prima osservato per l' *Aspergillus Fumigatus*, e perciò, in base a queste osservazioni preliminari, mi credetti fin d' allora autorizzato ad ammettere in termini generali che anche i Penicilli, come gli Aspergilli, vanno soggetti a una medesima legge biologica, propria degli esseri del regno a cui appartengono, cioè dei vegetali, i quali sono appunto regolati da un alternarsi di fasi di vita attiva e di vita latente; fasi che nei suddetti parassiti corrisponderebbero a una produzione massima e minima dei tossici specifici da loro elaborati.

Nell' ultima mia comunicazione a tale proposito, infine, facevo notare come queste fasi di *iper* e di *ipo-* attività tossica corrispondevano ancora, sebbene in modo non sempre ben definito, a delle modificazioni dei caratteri fisiologici più appariscenti, come p. e. del color del feltro e della superficie inferiore della patina, non che a variazioni della proprietà biochimica che molti dei Penicilli hanno di elaborare, contemporaneamente ai prodotti tossici, anche dei prodotti fenolici.

Nell' attuale memoria mi propongo ora di riassumere un po' più per esteso i risultati delle mie ricerche sui Penicilli verdi per ciò che riguarda le varie questioni sopra accennate e di far conoscere in modo particolare quanto fin quì mi è risultato sul ciclo biologico di questi ifomiceti in rapporto alle loro proprietà patogene.

Riporto quì il frutto di circa due anni di osservazioni eseguite metodicamente nelle diverse stagioni su 61 campioni di Penicilli verdi, molti dei quali corrispondono, ripeto, a varietà botaniche ben definite.

Questi Penicilli furono isolati, in parte da farine di *mais* e di frumento infette che servivano d' alimento quotidiano a diverse famiglie di pellagrosi, e in parte furono isolati dall' atmosfera degli ambienti, quasi sempre in condizioni oltremodo anti-igieniche e che costituivano l'abitazione delle stesse famiglie di pellagrosi.

La massima parte di questi Penicilli, cioè 53 campioni, furono isolati nei varî mesi del 1904 e in particolar modo durante la primavera ed estate; mentre gli altri 8 campioni furono isolati nei mesi di Febbraio e Marzo 1905.

La prima prova del potere patogeno fu sempre eseguita, per ogni singolo campione, pochi giorni dopo l'isolamento del parassita. In seguito le prove vennero poi ripetute metodicamente nelle varie stagioni successive, fino a tutto Novembre 1905; di modo che pei primi campioni l' osservazione dura da due anni, mentre che per quelli isolati per ultimo, l' osservazione dura da un sol anno circa.

Data la quantità non indifferente del materiale su cui mi ero prefisso di condurre questi studî, e le numerose ricerche che dovetti quindi compiere nei varî periodi dell'anno, non sempre mi fu possibile di ripetere tutte le esperienze in una determinata epoca, come era mio desiderio; ma dovetti spesso farle saltuariamente e non di raro a distanze considerevoli le une dalle altre. Ciò devesi ancora al fatto ch' io ero obbligato a tener conto anche dell' importanza dei risultati che ottenevo dai singoli casi, la quale spesso mi induceva a rifare un' esperienza anche a breve distanza dall' ultima, quando credevo necessario una pronta riconferma.

Con tutto ciò però dal complesso di queste mie numerose ricerche appare così sorprendente l' armonia e la costanza dei reperti ottenuti da ogni singolo campione, che sembrami di poter ormai escludere ogni dubbio sul valore dei fatti da me osservati, i quali vengono così una volta più a dimostrare la complessità dei fenomeni biologici di questi piccoli esseri vegetali.

I germi furono conservati su patate e su liquido Raulin facendo dei trapianti ogni 3-4 mesi. Per gli assaggi del potere tossico i parassiti venivan solo coltivati in capsule Thindal e su liquido Raulin, e tenuti a sviluppare alla temperatura ambiente nelle stagioni calde; mentre durante l' inverno l'esperienza veniva in generale riprodotta con germi tenuti a sviluppare alla temperatura costante di 17°-18°, che corrisponde appunto al loro *optimum*.

Durante l' inverno 1904-1905 però per la massima parte dei campioni le ricerche furono eseguite sia su parassiti fatti sviluppare alla suddetta temperatura costante, sia su parassiti fatti sviluppare a temperatura ambiente, e ciò anche per avere un criterio differenziale più esatto e per vedere fino a qual punto il diverso grado della temperatura in cui i germi si sviluppano possa avere importanza nei diversi ed opposti risultati che si ottengono nelle varie stagioni dell' anno [1].

I tossici poi, come al solito, furono estratti bollendo le patine in alcool, e raccogliendo il residuo con acqua; la prova del potere tossico di questo veniva fatta su cavie e su cani.

In media si inoculava l' estratto di $^1/_2$ patina per una cavia adulta del peso di circa 600 gr., mentre per 6-7 Kg. circa di peso di cane si inoculava l' estratto di una patina intera.

Solo nei casi in cui i risultati apparivano fin da principio molto netti, mi limitavo a compiere l' esperienza sopra un solo animale; mentre quando il risultato della prova riusciva un po' incerto, l' esperienza veniva subito ripetuta sopra due animali, cioè su due cavie o su una cavia e un cane.

Il complesso dei risultati di queste mie ricerche è ora tale che non mi è più possibile dividere i Penicilli in patogeni e non patogeni, e così pure non mi è più possibile di dividere le varietà patogene in quelle a tossici eccitanti e convulsivanti, e in quelle a tossici deprimenti e paralizzanti, come avea fatto fin quì in base ad osservazioni preliminari. E invero dalle ricerche continuate sono emersi nuovi fatti i quali, mentre servono a completare le nostre nozioni sulla biologia di questi esseri e a schiarire molte questioni che ricerche precedenti avean lasciato insolute, ci obbligano ancora a considerare questi parassiti, rispetto alle loro proprietà patogene, sotto un punto di vista assai più generico di quello che si poteva supporre.

Anzi tutto credo che, pel momento almeno, non sia più possibile ora parlare di varietà tossiche e varietà innocue, pel semplice fatto che molti campioni i quali per un periodo di più mesi ed anche di un anno e più, erano rimasti innocui, privi cioè della proprietà di elaborare dei tossici sia convulsivanti, sia

1 Notisi che il materiale per le seminagioni quasi sempre era preso da colture su patate fatte in primavera o in autunno, perchè più adatte per la loro abbondante sporificazione; di modo che di solito una medesima coltura ha servito per più esperienze eseguite nelle varie epoche dell' anno.

deprimenti, apparvero in seguito dotati delle proprietà tossiche più tipiche; mentre invece altri campioni rimasti patogeni per un periodo anche di circa due anni diventarono in seguito innocui.

Nelle ripetute prove sul potere tossico di questi 61 campioni di Penicilli uno solo poi è risultato finora costantemente sprovvisto del tutto o quasi di qualsiasi proprietà tossica; mentre tutti gli altri, ora in un' epoca, ora nell' altra, e dopo fasi più o meno lunghe di inattività tossica, apparvero dotati delle loro tipiche proprietà patogene. Non credo perciò imprudente di affermare fin d' ora che assai probabilmente tutti, o la massima parte almeno dei Penicilli verdi posson esser considerati patogeni; nello stesso modo che tutti o la maggior parte di essi, pur vegetando rigogliosi, in altri periodi possono essere considerati innocui, come vedremo più avanti.

Come non ci è più possibile dividere questi ifomiceti in varietà patogene e in varietà innocue, essendo tutti egualmente patogeni; così non ci è neppure più possibile dividerli in varietà dotate di proprietà tossiche deprimenti e paralizzanti e in varietà dotate di proprietà tossiche eccitanti e convulsivanti; giacchè è risultato inoltre, pure in modo evidente e indiscutibile, che una medesima varietà può, alternativamente e a periodi di distanza più o meno lunghi, elaborare ora dei tossici di natura eccitante e convulsivante, ora dei tossici di natura deprimente e paralizzante, come già ho dimostrato per la nuova specie di *Aspergillus Varians* da me descritta di recente.

Si tratta invece assai probabilmente di fasi speciali di attività tossica inerenti al ciclo biologico di questi parassiti, almeno da quanto ora si vedrà riassumendo queste ricerche; fasi che meritano certo di essere studiate sia per la loro importanza scientifica, sia perchè forse ci potranno anche essere di guida nell' interpretazione di molti fatti ancora oscuri che caratterizzano l' evoluzione e il diffondersi nell' endemia pellagrosa.

Data la natura dei nostri nuovi reperti, per dare un resoconto esatto di queste ricerche, non mi resterebbe ora che di descrivere le esperienze eseguite metodicamente per ogni singolo campione o varietà di Penicilli verdi da me studiati, incominciando dal momento in cui questi vennero isolati; giacchè solo l'esame minuzioso dei risultati ottenuti da queste numerose esperienze ci potrà dare un' idea esatta del potere patogeno dei suddetti parassiti sia rispetto al loro ciclo biologico annuale, sia

rispetto alle condizioni della località e ambiente in cui furono riscontrati, sia ancora rispetto alle sostanze alimentari dalle quali vennero isolati.

Siccome però è mia intenzione di rimandare a epoca più remota l' esposizione completa e dettagliata di questi studi, e ciò per comprendere un periodo di osservazione più lungo che mi sarà possibile; così ora mi limiterò ad alcune considerazioni d' indole generica per quanto riguarda le varie questioni sopra accennate, e riassumerò infine un po' per esteso i risultati delle esperienze eseguite con quattro varietà di Penicilli, bastandomi per ora di dare un concetto sulle principali variazioni che sono avvenute nelle proprietà patogene di questi ifomiceti nel periodo di circa 2 anni di osservazioni.

Per ciò che riguarda lo stato patogeno dei singoli Penicilli riscontrato al momento in cui vennero isolati, debbo anzi tutto far osservare che non di raro si ebbe a constatare delle notevoli diversità in rapporto alle stagioni dell' anno, e più ancora in rapporto alle diverse località pellagrogene in cui furono praticate le ricerche.

In quanto alle stagioni dell' anno dirò solamente che di regola ordinaria furono tosto riscontrati provvisti di proprietà patogene i Penicilli isolati durante le stagioni calde in genere e più precisamente nella primavera inoltrata e nel principio dell'autunno; mentre invece durante le stagioni fredde, e più propriamente nell' inverno, non che in sul principio della primavera, i campioni isolati apparvero a quell' epoca, e in modo prevalente, o affatto innocui, oppure provvisti di un potere tossico assai debole.

Riguardo alla natura dei tossici dei Penicilli, riscontrata all' epoca in cui questi furono isolati, posso pure fin d'ora affermare che mentre nelle stagioni fredde dell' anno prevalsero di solito i tossici a carattere deprimente e paralizzante, invece nelle stagioni calde prevalsero quelli a carattere eccitante e convulsivante. Questa prevalenza devesi a ogni modo ritenere in termini molto generali; perchè, come si vedrà nel lavoro completo, le due suddette proprietà tossiche diverse ed opposte si possono riscontrare in parassiti al momento in cui vengono isolati in qualsiasi epoca dell'anno, tanto, cioè, nelle stagioni fredde quanto in quelle calde; nello stesso modo che in qualsiasi stagione dell' anno si possono isolare dei parassiti perfettamente innocui.

Ancora più marcate, come dissi, apparvero queste diversità del potere patogeno dei Penicilli al momento in cui furono isolati rispetto alle località, alle diverse zone pellagrogene in cui furono rinvenuti. Sull' alto Apennino della Provincia di Reggio-Emilia, p. es., nelle stagioni calde prevalsero assai di più le forme patogene alle forme innocue; mentre invece in altre zone non montuose, ma della stessa Provincia, nella medesima stagione prevalsero le forme innocue alle patogene. Simili diversità e spesso anche più notevoli, furono riscontrate non di raro anche tra parassiti isolati in punti diversi di una stessa zona pellagrogena, ma di ciò mi occuperò più a lungo in nota speciale sulla diffusione dell' endemia pellagrosa.

Invece, finora almeno, non ho potuto osservare alcun rapporto fra le proprietà patogene possedute dal parassita al momento del suo isolamento e la natura del materiale infetto da cui proveniva e che serviva di alimentazione alle famiglie dei pellagrosi.

Così furono riscontrati Penicilli che presentarono tosto tipiche proprietà tossiche convulsivanti oppure deprimenti, tanto p. es. nelle farine di *mais,* quanto nelle farine di frumento; come nelle une e nelle altre furono riscontrati, senza diversità alcuna, dei Penicilli affatto innocui.

Le variazioni consistevano in questi casi invece nel numero dei parassiti e nelle specie dei medesimi; ma anche questa questione formerà pure oggetto del suddetto prossimo lavoro sulla diffusione dell' endemia pellagrosa, nel quale appunto dimostrerò come esistano delle vere flore speciali di questi parassiti vegetali in rapporto alle diverse zone pellagrogene.

Essendo lo scopo principale di questa nota di dare un' idea generale delle variazioni che avvengono nel potere patogeno dei Penicilli indipendentemente dal materiale nutritivo in cui si sviluppano, ma legate, come si vedrà, a condizioni esteriori in parte note e in parte a noi ancora del tutto sconosciute, riassumo qui per ora in breve il risultato delle mie ricerche su quattro delle varietà che furono oggetto di metodiche osservazioni per un periodo di circa due anni. Queste quattro varietà corrispondono rispettivamente ai N. 5, 6, 7 e 27 della mia collezione di Penicilli verdi, e di esse la I. al momento in cui fu isolata presentava proprietà tossiche deprimenti e paralizzanti, la II. presentava proprietà tossiche eccitanti e convulsivanti, mentre la III. e la IV. apparivano completamente innocue.

Nell' esporre i risultati delle proprietà tossiche delle singole esperienze eseguite nelle diverse epoche durante il 1904 e il 1905, accennerò anche alle condizioni di alcuni caratteri fisiologici principali dei quali ho creduto opportuno di tener conto in queste osservazioni; vale a dire, accennerò ai colori tipici del feltro e della superficie inferiore della patina, all' odore emanato non che alla proprietà o no che hanno questi Penicilli di elaborare dei prodotti fenolici *, meritando pure le variazioni che si osservano anche in questi caratteri del parassita d'esser fin d'ora conosciute, perchè non di raro in intimo rapporto col suo potere patogeno.

Nell' esporre i risultati delle esperienze, per esser breve, accennerò solamente all' esito definitivo dell' iniezione del tossico nell' animale, ricordando qui ancora una volta per sempre che a una cavia di 600 gr. circa inoculavo l' estratto di $^1/_2$ patina (ottenuta in capsule Thindal), cioè 7 cc. di una soluzione acquosa, giacchè il residuo dell' estratto alcoolico per ogni patina veniva raccolto con 14 cc. di acqua; mentre per ogni 6-7 Kg. di cane inoculavo l' estratto di una patina, cioè 14 cc. di una soluzione acquosa del residuo stesso. L' estrazione del tossico di solito si faceva all' 8.° giorno di sviluppo della patina, quando il germe almeno presentava uno sviluppo normale e rapido. Nei casi in cui lo sviluppo era lento, specialmente nell' inverno, per l' estrazione del tossico si attendeva che la patina avesse raggiunto il massimo sviluppo, il quale avveniva di solito 7-8 giorni più tardi che nei primi casi.

Varietà I. - Penicillo isolato il 5 *Maggio* 1904; coltivato subito dopo su liquido Raulin dà una patina con feltro di color verde cinereo e colla superfice inferiore di color giallo arancio chiaro. Fonde la gelatina assai lentamente.

1. Esperienza - 25 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa forte; feltro di color verde cinereo lievemente giallo e con superficie inferiore color limone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

* La ricerca dei composti fenolici fu eseguita solo mediante la classica reazione al cloruro di ferro suggerita dal Gosio e col metodo modificato dal Di-Pietro. I miei reperti quindi in proposito riguardano esclusivamente i composti dimostrabili colla suddetta reazione.

Cane di 7 Kg: inoculato, muore dopo 3 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi, specialmente del peritoneo che presenta inoltre emorragie multiple.

2. Esper. - 27 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa forte; feltro di color verde cinereo lievemente giallo e con superficie inferiore di color limone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 650 gr.: inoculata, muore dopo 2 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

3. Esper. - 24 *Giugno* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido: odor lieve di muffa; feltro di color verde cinereo chiaro lievemente giallo e con superficie inferiore giallo arancio scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 15 Kg.: poco dopo iniettato presenta lievi fenomeni di depressione, sonnolenza ecc. e poi dopo 24 ore si rimette.

4. Esper. - 30 *Luglio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo normale e rapido; odor di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore di color giallo limone.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6500 gr.: iniettato, presenta gravissimi fenomeni di depressione e muore dopo 2 ore.

Autopsia: intensa congestione del peritoneo con diffusi focolai emorragici e con 150 cc. di essudato peritoneale siero sanguinolento.

5. Esper. - 1 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temperat. ambiente: sviluppo più lento del solito; odor lieve di muffa; feltro di color verde cinereo scuro bleuastro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr: iniettata, muore dopo 2 ore con gravi fenomeni di depressione.

Autopsia: lieve congestione del peritoneo.

6. Esper. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a temp. costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odor forte di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6 Kg.: presenta tremori diffusi e intensi e gli arti fortemente spastici; entra presto in stato comatoso, e muore 3 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: cangestione mediocre del peritoneo.

Cavia di 670 gr.: presenta qualche lieve tremore diffuso e muore con gravi fenomeni di depressione 2 ore dopo l' iniezione.

7. Esper. - 16 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odor forte di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 790 gr.: muore con gravissimi fenomeni di depressione dopo 3 ore.

8. Esper. - 27 *Gennaio* 1905.

*a*) Patina cresciuta a temperatura costante di 18°: sviluppo normale e rapido; odore lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superfice inferiore giallo scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1.ª di 650 gr. - lievi fenomeni di depressione e muore 3 giorni dopo l' iniezione.

Cavia 2.ª di 600 gr. - presenta lievi fenomeni di depressione e poi si rimette.

*b*) Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo assai lento, ma completo; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo nerastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 660 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

9. Esper. - 9 *Febbraio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento ma completo; quasi inodora; feltro di color cinereo e superfice inferiore color rosso mattone.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 12 Kg.: non presenta alcun fenomono di intossicamento.

10. Esper. - 6 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e normale; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

11. ESPER. - 25 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e normale; odor lieve di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore giallo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7.500 Klg.: nessun fenomeno di intossicamento.

12. ESPER. - 1 *Giugno* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor forte di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore giallo pagliarino.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7800 gr. muore dopo 6 ore con gravissimi fenomeni di depressione e con diarrea sanguinolenta.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi interni, specialmente del peritoneo e intestino.

13. ESPER. - 16 *Giugno* 1905.

Patina a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor forte di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore giallo pagliarino.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane 9500 gr. muore dopo 5 ore con gravissimi fenomeni di depressione.

Autopsia: intensa congestione di tutti gli organi interni, specialmente del peritoneo e intestino.

14. ESPER. - 25 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde scuro giallastro; superficie inferiore giallastra.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 4500 gr.: presenta tremori diffusi e intensi, convulsioni tetaniformi gravi e frequenti scariche diarroiche: tali fenomeni durano 3 giorni, alla fine dei quali l'animale muore.

Autopsia: congestione di tutti gli organi interni, specialmente dell' intestino.

15. ESPER. - 30 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde scuro giallastro: superficie inferiore giallastra.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi tipiche che durano 14 ore; segue stato comatoso e morte 16 ore dopo l'iniezione.

16. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor di muffa; feltro verde cinereo scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 850 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi e tipiche; morte dopo 4 giorni.

17. Esper. - 22. *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo normale e rapido; odor di muffa penetrante; feltro verde grigio celeste; superficie inferiore giallo cromo chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 750 gr.: muore 16 ore dopo l'iniezione con gravi fenomeni di depressione.

Varietà II. - Penicillo isolato il 5 *Maggio* 1904. Coltivato subito dopo l'isolamento in liquido di Raulin dà una patina con feltro di color verde celeste iridescente e colla superficie inferiore di color rosso mattone scuro. Fonde la gelatina assai rapidamente.

1. Esperienza - 25 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor fortissimo di muffa; feltro di color verde celeste iridescente; superficie inferiore rosso mattone scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cane di 6 Kg.: tremori e convulsioni tetaniformi gravi che durano circa tre giorni; segue stato comatoso e morte 6 giorni dopo l'iniezione.

Autopsia: Lieve stato di congestione degli organi interni.

2. Esper. - 24 *Giugno* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; odor fortissimo di muffa; feltro di color verde celeste iridescente; superficie inferiore rosso mattone scuro.

Estratto alcoolico: reazion fenolica nulla.

Cane di 15 Kg.: tremori diffusi e convulsioni tetaniformi gravi e tipiche che durano 4 giorni di fila; segue stato comatoso e la morte 7 giorni dopo l'iniezione.

Autopsia: lieve congestione degli organi interni.

3. Esper. - 29 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temp. ambiente: sviluppo lento, ma completo; odor di muffa; feltro verde cinereo; superficie inferiore color castagno.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7 Kg.: lievi tremori diffusi e arti spastici. Tali fenomeni durano 2 giorni; in seguito l'animale mangia e beve e si rimette del tutto.

4. Esper. - 31 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temp. ambiente: sviluppo lento, ma completo; odor di muffa; feltro verde cinereo; superficie inferiore color castagno.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 6500 gr.: tremori lievi e diffusi, ma senza fenomeni tetaniformi; morte 20 ore dopo l'iniezione.

Autopsia: congestione intensa del peritoneo e intestino; scarso essudato peritoneale siero sanguinolento.

Cavia 2. di 720 gr.: tremori lievi e diffusi; morte in stato comatoso 40 ore dopo l' iniezione.

5. Esper. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento; tenue odor di muffa; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore color ruggine.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 750 gr.: tremori diffusi assai lievi; stato di depressione grave; morte 37 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: congestione intensa del peritoneo e intestino.

6. Esper. - 16 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo assai lento; tenue odor di muffa, feltro grigio chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color rosso vinoso, carnosa.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 680 gr. Nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. 500 di gr. Nessun fenomeno di intossicamento.

7. Esper. - 7 *Febbraio* 1905.

*a)* Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento; tenue odor di muffa; feltro grigio chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color rosso-vinoso.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 760 gr.: muore dopo 20 ore con fenomeni dei depressione.

Cavia 2. di 500 gr.: muore dopo 12 ore con fenomeni di depressione.

Autopsia: Congestione intensa del peritoneo e intestino.

*b)* Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lentissimo, ma completo; lievissimo odor di muffa; feltro grigio chiaro con macchie giallastre; superficie inferiore di color giallo rossastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 860 gr.: muore con fenomeni di depressione dopo 4 giorni.

Cavia 2. di 420 gr.: muore con fenomeni di depressione dopo 14 ore.

Autopsia: Congestione intensa del peritoneo e intestino.

8. ESPER. - 6 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo lento e incompleto: aspetto carnoso; odor di muffa; feltro grigio chiaro con macchie giallastre; superficie inferiore di color rossiccio scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 700 gr.: Nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 650 gr.: Nessun fenomeno di intossicamento.

9. ESPER. - 1 *Giugno* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un pò lento, ma normale; odor lieve di muffa; feltro verde grigio scuro; superficie inferiore color caffè scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cane di 7. Kg.: tremori diffusi tipici, ma non gravi e senza gli accessi tetaniformi; arti spastici. Dopo 24 ore circa l' animale si rimette quasi del tutto.

Cavia di 600 gr.: qualche lievissimo tremore diffuso con fenomeni di depressione che scompaiono dopo 24 ore circa.

10. ESPER. - 3 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; lieve odor di muffa; feltro verde chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color bianco sporco con macchie gialle.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 1. di 560 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 5 ore.

Cavia 2. di 700 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 2 ore.

11. ESPER. - 25 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente; sviluppo lento; odor lieve di muffa: feltro verde chiaro con macchie bianche; superficie inferiore color castagno scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cane di 6 Kg.: nessun fenomeno di intossicamento.

12. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento; inodora; feltro verde chiaro con chiazze bianche; superficie inferiore di color giallo nerastro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

13. Esper. - 25 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e normale; odor lieve di muffa; feltro verde grigio giallastro; superficie inferiore di color rosso scuro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 800 gr.: muore con lievi fenomeni di depresssione progressiva dopo 4 giorni.

Autopsia: lieve congestione degli organi interni.

Varietà III. - Penicillo isolato il 6 Gennaio 1904 il quale, coltivato subito dopo l' isolamento, dà una patina con feltro verde scuro e colla superficie inferiore bianca; fonde la gelatina assai lentamente (quasi non fondente).

1. Esper. - 26 *Febbraio* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odore di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia di 600 gr.: non presenta alcun fenomeno di intossicamento.

2. Esper. - 7 *Marzo* 1904.

Patina cresciuta a 18°: - sviluppo rapido e completo; odore di muffa; feltro di color verde scuro; superficie inferiore bianca

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

3. Esper. - 4 *Maggio* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; odor di muffa; feltro di colore verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica discreta.

Cane di 8400 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

4. Esper. - 11 *Agosto* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapidissimo; odor lieve di muffa; feltro di color grigio cinereo: superficie inferiore di color bianco sporco.

Estratto alcoolico: reazione fenolica mediocre.

Cane di 5 Kg.: fortissimi e tipici tremori diffusi, accompagnati da grave eccitamento psichico e da intense convulsioni tetaniformi; morte 20 ore dopo l' iniezione.

Autopsia: congestione lieve organi interni e del peritoneo.

5. Esper. - 20 *Novembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odore speciale di tartuffi; feltro verde scuro; superficie inferiore bianco lattea.

Estratto alcoolico: reazione fenolica mediocre.

Cavia di 760 gr.: tremori e convulsioni tetaniformi gravi; muore 16 ore dopo l' iniezione.

6. Esper. - 7 *Gennaio* 1905.

*a*) Patina cresciuta a 18°: sviluppo un pò lento; odor di muffa; feltro verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 800 gr.: lievissimi tremori che scompaiono dopo 24 ore.

Cavia 2. di 400 gr.: tremori tipici; morte dopo 21 ore.

*b*) Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo assai lento e incompleto; lieve odore di muffa; feltro verde scuro, superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 1. di 700 gr.: tremori diffusi, ma senza convulsioni tetaniche e che cessano dopo 12 ore.

Cavia 2. di 500 gr.: tremori diffusi e lievi; morte dopo 29 ore.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odor di muffa; feltro verde chiaro cinereo; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica quasi nulla.

Cavia 1. di 750 gr.: intensi tremori e convulsioni tetaniche; morte dopo 2 ore.

Cavia 2. di 600 gr.: intensi tremori e convulsioni tetaniche; morte dopo 3 ore.

8. Esper. - 2 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; lieve odor di muffa; feltro verde chiaro; superficie inferiore bianco sporco.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla.

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cane di 7050 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

9. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; odor speciale di tartuffi; feltro verde scuro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica tipica e intensa.

Cavia di 650 gr.: tremori e convulsioni tetaniche intense; morte dopo 40 ore.

10. Esper. – 7 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e completo; odor gradevole di muffa; feltro verde chiaro bleuastro; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica traccie.

Cavia 700 gr.: tremori e convulsioni tetaniche fortissime; morte dopo 5 ore.

Varietà IV. - Penicillo isolato il 1 *Agosto* 1904, avente, al momento dell'isolamento, una patina con feltro di color verde gialliccio e una superficie inferiore di color arancio chiaro. Fonde la gelatina rapidissimamente.

Esper. - 1 *Settembre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro di color verde gialliccio; superficie inferiore di color giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (l' estratto ha i colori dell' iride).

Cane di 8500 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia di 600 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

2. Esper. – 29 *Ottobre* 1904.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro di color verde gialliccio; superficie inferiore di color giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (l' estratto ha i colori dell'iride).

Cavia 1. di 600 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

3. Esper. – 7 *Dicembre* 1904.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo un pò lento ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

4. Esper. – 4 *Febbraio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un pò lento, ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia 1. di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

5. Esper. - 11 *Aprile* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo un po' lento ma completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto alcoolico iridescente).

Cavia 550 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

6. Esper. - 2 *Luglio* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo lento e incompleto; inodora; feltro di color cinereo; superficie inferiore bianca e mucilaginosa.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente)

Cavia di 580 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

7. Esper. - 15 *Agosto* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido e completo; inodora; feltro grigio cinereo; superficie inferiore bianca.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 550 gr.: presenta lievi fenomeni di depressione e muore 3 giorni dopo l' iniezione.

8. Esper. - 15 *Settembre* 1905.

Patina cresciuta a temperatura ambiente: sviluppo rapido, tipico e completo; inodora; feltro verde gialliccio; superficie inferiore giallo arancio chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 750 gr.: tremori tipici e convulsioni tetaniche che durano 24 ore circa: morte 40 ore dopo l' iniezione.

Cavia 2. di 550 gr.: tremori e convulsioni tipiche; morte dopo 25 ore.

9. Esper. - 22 *Novembre* 1905.

Patina cresciuta a 18°: sviluppo rapido e normale; inodora; feltro verde cinereo chiaro; superficie inferiore color rosso mattone chiaro.

Estratto alcoolico: reazione fenolica nulla (estratto iridescente).

Cavia 1. di 700 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

Cavia 2. di 650 gr.: nessun fenomeno di intossicamento.

TABELLA riassuntiva delle diverse fasi di attività tossica delle 4 varietà *Penicillum Glaucum* su descritte.

| Risultato delle prove | Epoche in cui fu esperimentato il potere tossico del parassita | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | Epoche in cui fu isolato il parassita |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1904 | | | | | | | | | | | | 1905 | | | | | | | | | | | | |
| | Genn. | Febbr. | Marzo | Aprile | Maggio | Giugno | Luglio | Agosto | Settem. | Ottobre | Novem. | Dicem. | Genn. | Febbr. | Marzo | Aprile | Maggio | Giugno | Luglio | Agosto | Settem. | Ottobre | Novem. | Dicem. | |
| I.ª Varietà | | | | | D. | D.1 | D. | | | D. | TD | D. | D.1 | O. | | O. | | D. | D. | T. | T. | | D. | | 5 Maggio 1904 |
| II.ª id. | | | | | T. | T. | T. | | T. | T.1 | T.1 | | | D. | | O. | | T.1 | T.1 | O. | O. | | D.1 | | 5 Maggio 1904 |
| III.ª id. | | O. | O. | | O. | | | T. | | | T. | O. | T.1 | | | T. | | | O. | | T. | | T. | | 6 Genn. 1904 |
| IV.ª id. | | | | | | | | | O. | O. | | O. | | O. | | O. | | | O. | O. | T. | | O. | | 1 Agosto 1904 |

N. B. Gli effetti ottenuti dalle iniezioni degli estratti delle patine cresciute nei vari mesi dell' anno sono nella tabella indicati con T. - che corrisponde ad un' azione tossica eccitante e tetaniforme:

» T l. - id. id. lievemente eccitante e tetaniforme;

» D. - id. id. deprimente;

» D,l. - id. id. deprimente lieve;

» O. - id. id. nulla. (fase atossica)

Come chiaramente appare dai risultati delle esperienze sopra esposte, e più ancora dalla tabella riassuntiva dei reperti ottenuti sugli animali mediante le iniezioni degli estratti alcoolici delle patine coltivate nelle varie epoche dell' anno, la proprietà che hanno i Penicilli di elaborare dei tossici specifici pellagrogeni è tutt' altro che costante.

Nel corso di circa due anni, infatti, le singole varietà da me studiate hanno presentato, e di solito anche più di una volta e a brevi periodi di distanza, delle notevoli variazioni non solo nell' intensità dei tossici da loro elaborati, ma pur anco nella natura dei medesimi; per quanto il materiale di coltura sia sempre stato mantenuto scrupolosamente invariato.

Riguardo al grado d' intensità dei tossici elaborati noi vediamo d' ordinario, durante il periodo di tempo di un anno, un continuo succedersi e alternarsi di fasi, nelle quali la produzione del tossico, per intensità e quantità, ora raggiunge il suo massimo grado, ora diminuisce o scompare anche del tutto.

Dei Penicilli p. es. che per un determinato periodo di tempo di 2-3 mesi e più ci dànno di continuo dei tossici potentissimi, ora di natura deprimente e paralizzante, e capaci perciò di uccidere gli animali anche in brevissimo periodo di tempo e con sintomi più tipici che si possano immaginare; in seguito, come vedesi nelle varietà I. e II. qui descritte, ora danno dei tossici assai attenuati e poco caratteristici, di modo che anche in dosi più elevate di prima non arrivano a determinare la morte di animali della stessa specie e dello stesso peso, come non arrivano a determinare in questi dei sintomi tipici e propri dei tossici pellagrogeni da me più volte descritti; ora infine perdono completamente anche questo potere di elaborare dei tossici e appaiono perciò innocui.

Non è un fenomeno dovuto ad un'attenuazione del parassita nel senso comune della parola, come potrebbe sembrare, questa diminuzione o scomparsa dell' attività tossica; giacchè, ripeto, le fasi di attività tossica massima e minima si succedono e si alternano più volte nel periodo di un anno e spesso anche in un modo abbastanza regolare e ritmico; sebbene la durata di queste due fasi varii di solito alquanto tra varietà e varietà del parassita stesso.

Dal complesso delle molteplici osservazioni di questi ultimi anni, su tutti i campioni di Penicilli che posseggo, sembra fin d' ora risultare che per questi parassiti il ciclo biologico sia alquanto più complesso di quello che si potea supporre in base alle prime osservazioni; giacchè le suddette fasi di attività tossica massima e minima appaiono costituite di due tipi ben diversi, vale a dire, di quelle che sono in diretto rapporto colle diverse stagioni dell' anno, e di quelle che invece per le quali questo rapporto non risulta affatto; mentre, ripeto, tanto le une che le altre sono affatto indipendenti dal mezzo colturale sul quale i parassiti si sviluppano.

Le fasi che si presentano in rapporto colle stagioni dell' anno, sono quelle che finora ho potuto meglio determinare e, come già feci osservare nelle mie prime due note precedenti, corrispondono a quelle da me già descritte per gli Aspergilli.

Durante l' inverno questi ifomiceti, se anche fatti crescere a una temperatura che corrisponda a quella del loro *optimum* di sviluppo (17°-18°), di solito presentano un'attività tossica minima o nulla; mentre invece nella primavera tale attività raggiunge il suo massimo grado. Durante l' estate però, e più precisamente nei periodi più caldi, l'attività tossica non di raro diminuisce ancora, fino anche a scomparire, analogamente a quanto si osserva in alcuni mesi invernali, per poi riapparire di bel nuovo durante l' autunno, dotata a un dipresso dello stesso grado che avea durante la primavera.

La fase estiva di attività tossica minima fu da me constatata in moltissimi dei Penicilli della mia collezione, in modo speciale nel 1905, e precisamente nei mesi di Giugno e Luglio, durante i quali la temperatura nei nostri laboratorî oscillò per più giorni sui 38°-39° e raggiunse anche i 40°; mentre nell' anno precedente, sia pel numero più scarso di osservazioni, sia perchè la temperatura della stagione non fu così eccessiva, questa fase di attività tossica minima estiva era passata quasi inosservata. Invece la fase di attività tossica minima invernale fu, in molti campioni almeno, constatata sia durante il 1904, sia durante il 1905, sebbene in grado spesso diverso per le singole varietà di Penicilli. Per quanto quindi l' esistenza d' una fase di attività minima estiva non sia ancor stata confermata per due anni, tuttavia il numero complessivo delle mie osservazioni in proposito è tale ch' io mi credo autorizzato in base ad esse di affermare, almeno in termini molto generali, che nelle nostre condizioni di clima le fasi di attivita tossica massima negli ifomiceti in discorso possone essere due; una primaverile e l'altra autunnale, come due possano essere le fasi di attività tossica minima, una invernale e l' altra estiva.

A queste fasi, ripeto, noi dobbiamo però dare un significato molto generico; giacchè non di raro si osservano, come si vedrà meglio nel mio lavoro completo sul ciclo biologico dei Penicilli, varietà che in determinate condizioni possono dare dei tossici potentissimi anche nell' inverno ed estate; come si osservano di quelle che appaiono del tutto innocue sia nella primavera che nell' autunno.

Faccio infine osservare che a queste fasi di attività tossica massima e minima in rapporto alle stagioni dell' anno e desunte da ripetute riprove sui parassiti, corrispondono esattamente i risultati ottenuti dalle prove del potere patogeno degli stessi parassiti eseguito subito dopo il loro isolamento sia da farine infette, sia dall' atmosfera dei diversi ambienti. Come dissi brevemente infatti più sopra nella prima parte riassuntiva

generale di questa memoria i Penicilli risultarono tossici al momento del loro isolamento prevalentemente durante la stagione calda e più precisamente durante la primavera inoltrata e l'autunno; mentre durante l'inverno questi ifomiceti apparvero prevalentemente dotati o di proprietà tossiche minime oppure del tutto innocui.

Su questo fatto, che corrisponde perfettamente a quanto già avea osservato per l' *Aspergillus Fumigatus*, richiamo l' attenzione in modo particolare; giacchè, secondo me, costituisce la più bella riprova che trattasi realmente di un vero fenomeno biologico legato alle stagioni dell'anno e non già ad altre cause, come per es. al mezzo colturale (patate ecc.) su cui i parassiti vennero conservati durante il periodo di osservazione.

Il secondo tipo di fasi di attività tossica massima e minima, come dissi più sopra, sarebbe caratterizzato da lunghi periodi in cui il parassita si mantiene ora dotato di proprietà tossiche, soggette alle variazioni su indicate e in rapporto alle diverse stagioni, ora invece si mantiene perfettamente innocuo o quasi in qualsiasi epoca dell' anno.

Le due ultime varietà su descritte, specialmente la IV., ci dànno un' idea abbastanza esatta di questi lunghi periodi di inattività tossica dell' ifomiceta e indipendenti dalle stagioni dell' anno: di esse infatti la prima (Varietà III) rimane innocua dal Gennaio all'Agosto 1905; mentre la seconda (Varietà IV.) lo rimane per un'anno, cioè dal Settembre 1904 al Settembre 1905.

Siccome poi ho anche osservato delle varietà di Penicilli che, mentre apparvero dotate di potere tossico per un periodo di un anno e più, si presentarono invece nell' anno successivo costantemente innocue; così si potrebbe pensare in questo caso a uno stato di esaurimento del parassita che molto probabilmente avviene non solo in vitro, ma anche in natura e che è legato forse a condizioni speciali del suo ciclo biologico.

A ogni modo si tratterebbe sempre d' un esaurimento solo della proprietà di elaborare dei tossici; giacchè i parassiti durante questa fase crescono rigogliosi; sporificano in modo normale; conservano i loro colori tipici più o meno vivaci come nella fase di attività tossica, nè presentano fin qui alcune notevoli modificazioni negli altri caratteri botanici. Questo fatto credo che abbia contribuito non di poco a trarci in sul principio in inganno e a farci pensare che le varietà osservate nelle suddette condizioni fossero realmente da considerarsi come innocue in qualsiasi periodo della loro evoluzione. Le *fig. 9* e *10* della Tav. qui annessa riproducono la III. Varietà su descritta nelle sue fasi di inattività e attività tossica e indipendenti dalle stagioni dell' anno.

Qualunque sia la causa di questa periodicità tossica del parassita, ho voluto accennare ad essa fin d' ora per l' importanza che presenta nel campo biologico e pel valore che forse potrà avere nell' interpretazione della diffusione della pellagra, e dei periodi di recrudescenza che in determinate annate si notano in questa malattia.

Mi riservo perciò più tardi, a studio più completo, di ritornare su questo importante argomento.

Se per questi lunghi periodi di inattività tossica non abbiamo alcun dato ancora che ci permetta di investigare la causa e la natura dei medesimi; invece dei dati non ci mancano per caratterizzare le fasi biologiche annuali di attività tossica massima e minima che sono in rapporto colle stagioni. Queste ultime fasi, infatti, sono accompagnate da tali variazioni di alcuni caratteri botanici del parassita, che per la loro costanza e per la loro natura mi par che meritino d'esser note fin d'ora; molto più che ci possono servire, io credo, per valutare e interpretare lo stesso fenomeno biologico in discorso, il quale dopo tutto forma l'oggetto principale dell'attuale memoria.

Voglio qui brevemente accennare al modo più o meno rigoglioso con cui si sviluppano questi ifomiceti, all'aspetto generale delle loro patine, non che alle variazioni che si succedono nel color tipico del feltro e della superficie inferiore della patina. Solo in linea secondaria voglio accennare ancora alle variazioni che avvengono nell'odore tipico emanato da questi ifomiceti e infine alle variazioni che avvengono nella proprietà che molti di essi posseggono di elaborare dei prodotti fenolici contemporaneamente ai tossici specifici.

Anzi tutto i parassiti durante le fasi di attività tossica minima sia invernale, sia estiva, si sviluppano in generale più lentamente del solito e meno rigogliosi; di modo che, mentre nelle fasi di attività tossica massima impiegano di solito 4-5 giorni a dare una patina rigogliosa e completamente sporificata, invece nelle altre fasi impiegano 7-8-10 e perfino 20 giorni e più a crescere e a sporificare. Inoltre la patina nei periodi di inattività tossica è più grossa, più carnosa e d'aspetto più mucilaginoso del solito.

I colori tipici del feltro dei così detti Penicilli verdi, che durante il periodo di attività tossica sono vivaci e caratteristici per ogni singola varietà, invece durante il periodo di inattività invernale e estiva perdono la loro tipica vivacità, diventano sbiaditi, più chiari del solito e tendono ad assumere un tipo unico di verde cinereo con chiazze biancastre, miste anche non di raro a traccie di color giallo sporco.

Il colore della superficie inferiore della patina (ora bianca, ora gialla nelle sue diverse gradazioni, ora di color marone ecc.), pure caratteristico delle singole varietà dei Penicilli verdi, durante la fase di inattività tossica assume invece di solito tinte più cariche e più oscure e perde in qualche caso anche perfino il suo tono originale.

Così p. es. le patine di color giallo limone chiaro possono diventare di color rosso vinoso oppure nerastro e quelle di color giallo arancio possono diventare di color giallo ocra più o meno scuro.

Dalle *fig. 1, 2, 3* e *4* nonchè dalle *fig. 5, 6, 7* e *8* della Tav. qui annessa, rappresentanti fedelmente le patine delle varietà I. e II. su descritte nelle loro diverse fasi di attività tossica in rapporto colle stagioni dell'anno, si può farsene un concetto abbastanza esatto di queste variazioni di colori.

L' odore tipico dei Penicilli cambia pure non di raro, specialmente nella sua intensità, a seconda se il parassita si trova nella sua fase di attività tossica o no. Di solito l' odore è più caratteristico, più intenso e penetrante durante la fase di tossicità massima; è invece lieve e meno caratteristico e diventa spesso anche nauseante, assumendo per il più il carattere di odore di verdure, specialmente di cavoli in putrefazione, durante le fasi inattive invernali ed estive.

Vi sono però varietà che si mantengono inodore o quasi in tutte le varie fasi; come esistono varietà che anche durante le diverse fasi ora emanano odor gradevole di tartuffo, ora odor di fungo mangiareccio, ora odore di gaz illuminante assai intenso, ora infine odor comune di muffa. Vedrò in seguito con maggior numero di ossservazioni quale può essere il vero significato anche di queste variazioni e i possibili loro rapporti coll' attività tossica del parassita.

La proprietà che hanno molti Penicilli, al contrario degli Aspergilli, almeno delle varietà da me studiate [1] di elaborare dei prodotti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico, ha pure non di raro dei rapporti abbastanza diretti colle suddette fasi tossiche e atossiche. I Penicilli generalmente producono una maggior quantità dei suddetti fenolici durante il periodo di attività tossica massima, e più precisamente quando il tossico da loro elaborato ha proprietà convulsivanti; mentre durante i periodi di attività tossica minima la produzione dei fenoli si riduce alquanto o finisce anche per scomparire.

1 Recentemente però il Gosio (La reazione fenolica del granoturco ecc. *Rivista pellagrologica ital.* N. 1 1906) avrebbe osservato che anche gli Aspergilli e precisamente l' *Aspergillùs Flavescens* e il *Varians* sono capaci di produrre e in gran copia « i composti tipici nel modo di reagire col cloruro ferrico »; mentre questo reattivo da me pure usato sugli estratti aspergillari nelle ripetute riprove diede sempre risultati negativi. Dati questi risultati così diversi ottenuti collo stesso metodo da me e dal Gosio, specialmente sull' *Asper. Varians,* sarebbe ora importante di sapere se le ricerche del Gosio furono fatte sulla medesima varietà di Aspergillo da me di recente descritta, o se pure furono fatte, come è più probabile, sull'*Asp. Varians* Whemer affatto diverso dal mio e che il Dott. Tiraboschi, collaboratore del Gosio nei Laboratori della Sanità Pubblica, avrebbe isolato dal *mais* guasto, « *Annali di Botanica* Vol. II. Fasc. I. ».

Ciò servirebbe a stabilire se la discrepanza tra i miei reperti e quelli del Gosio, che in tal caso almeno non si può attribuire alla diversità del metodo di ricerca, si debba ricercare nella diversa specie o varietà dell' ifomiceta su cui si è sperimentato o se invece si debba ricercare nelle fasi biologiche diverse, durante le quali furono studiati i medesimi ifomiceti. Non sarebbe da meravigliarsi infatti che gli Aspergilli si comportassero anche nella produzione dei composti fenolici analogamente ai Penicilli; pei quali ultimi noi abbiamo appunto dimostrato che non tutte le varietà reagiscono nello stesso modo al cloruro ferrico e che di più

Anche questo rapporto è però tutt' altro che costante; giacchè noi vediamo spesso dei Penicilli tossici o innocui ma eminentemente fenolici, i quali più avanti e in altre epoche dell' anno invece ci forniscono degli estratti alcoolici fortemente dotati di proprietà tossiche tetaniche, ma che non danno alcuna reazione col cloruro ferrico.

Moltissimi poi sono stati i Penicilli dotati di proprietà tossiche sia deprimenti, sia tetaniche che finora non diedero mai alcuna traccia della suddetta reazione fenolica (Vedi p. es. le varietà I. II.); come non mancarono quelli i di cui estratti diedero un' intensa reazione fenolica, mentre erano affatto sprovvisti di qualsiasi proprietà tossica.

Sulla presenza della tipica reazione fenolica in estratti di Penicilli che poi sugli animali apparvero perfettamente innocui, insisto in modo singolare perchè è questa, secondo me, la prova più eloquente che si tratta in realtà di due principî diversi, al contrario di quanto ammise il Gosio, e come apparirà ancor meglio in una nota apposita. Per ora mi basti di poter affermare che il rapporto tra la proprietà tossica e quella di elaborare dei prodotti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico è pure tutt' altro che costante anche per gli stessi Penicilli; il che dimostra una volta ancora come la classica reazione fenolica non possa avere una grande importanza diagnostica nella ricerca dei tossici pellagrogeni.

ancora la medesima varietà può comportarsi verso questa reazione in modo diverso ed opposto a seconda della fase biologica in cui si trova. Notisi che la diversità delle due suddette specie di *Aspergillus Varians* mi fu confermata di recente anche dallo stesso Tiraboschi in una sua gentilissima del 12-2-'06, in seguito ad esame di confronto del nuovo parassita da me descritto e da lui richiestomi circa due mesi prima. Mi permetto di far rilevare questo fatto, perchè si possa dare una giusta interpretazione alle parole del Gosio, il quale nella sopra accennata nota sembra voglia far credere che la specie di *Aspergillus Varians* non possa essere che una sola, quella naturalmente sulla quale egli ha eseguito le sue ricerche.

Il Gosio, che mi accusa di giudizii gratuiti perchè affermai che l'*Asper. Varians* da me illustrato non produce fenoli riconoscibili alla classica reazione, pur essendo esso dotato di proprietà tossiche potentissime, dovrà quindi riconoscere che le nostre divergenze sulla presenza o no di composti fenolici negli estratti dei parassiti pellagrogeni non sono poi così enormi e di così gravi conseguenze, come egli vorrebbe far supporre; giacchè vediamo che queste si possono benissimo spiegare, finora almeno, anche basandosi solamente sui risultati ottenuti colla reazione al cloruro ferrico, alla quale egli pure, non ostante la grande competenza, in materia che si vuole appropriare, fin qui si è limitato, senza ricorrere a quelle ricerche più rigorose e di primo ordine a cui accenna e che, come egli dice, sarebbe troppo pretendere da me.

Mi riservo del resto di tornare sull' argomento dopo un opportuno esame di confronto della specie di Aspergilli studiati dal Gosio e del Tiraboschi e che hanno la proprietà di dare dei composti fenolici che reagiscono al cloruro ferrico.

In attesa pertanto della nuova luce che porterà il Gosio nella ricerca dei composti fenolici nei parassiti vegetali, continuerò, nel limite delle mie forze, il lavoro seguendo la via che mi sono prefisso e colla speranza soltanto che il modesto contributo dell' opera mia possa un giorno esser di qualche vantaggio all'umanità sofferente. Intanto osservo con piacere che ora il Gosio va limitando

Rimane ora a dire delle variazioni che avvengono nella natura dei tossici stessi e da me ormai constatate nella massima parte dei 61 campioni di Penicilli verdi che formano oggetto di questi studi.

Anche questi ifomiceti, analogamente a quanto già dimostrai per la nuova specie di *Aspergillus Varians* da me di recente descritta, e come appare evidente dal riassunto delle esperienze sulla I. e II varietà sopra esposta, possono alternativamente elaborare dei tossici ora dotati di proprietà eccitanti e convulsivanti, ora dotati di proprietà deprimenti e paralizzanti

Germi che per 4-5 mesi di fila e anche per un'anno e più avevano dato soltanto dei tossici di natura o convulsivante o deprimente, in seguito entrarono infatti in un' altra fase, elaborando tossici di natura diversa ed opposta alla prima, cioè elaborando tossici o deprimenti o convulsivanti. Queste fasi ora sono brevi, ora, ripeto, sono lunghe e possono durare anche un anno e più, e il passaggio dall'una all'altra fase avviene direttamente, oppure invece, e più di frequente, avviene dopo un periodo di 1-3 mesi e più di assoluta inattività tossica.

Nessun altro dato importante posseggo finora su questo passaggio dall' una all' altra fase di attività tossica, sia rispetto alle eventuali modificazioni che possono avvenire nei caratteri botanici del fungo, sia riguardo ai loro rapporti colle varie epoche dell' anno. Solamente a tale proposito faccio rimarcare ancora come questi passaggi nel caso mio furono sempre indipendenti dal mezzo colturale su cui il parassita si era sviluppato, e solo da ricerche continuate su vasta scala sarà possibile stabilire se essi siano legati veramente a qualche legge biologica, o se invece dipendano da condizioni esteriori.

Intanto mi permetto qui richiamare l' attenzione sull' importanza di questo nuovo fenomeno nell' interpretazione di alcune questioni che riguardano l' endemia pellagrosa e rimaste finora insolute; come p. es. la prevalenza delle forme acute in alcune epoche dell' anno e le oscillazioni spesso notevolissime nei rapporti tra le forme acute e forme croniche che si hanno nelle diverse annate e nelle diverse zone pellagrogene. A tale proposito voglio ricordare per esempio come in tutto il 1905 al nostro Istituto non pervenne neppure un caso affetto da pellagra acuta (tifo pellagroso); mentre nell' anno precedente entrarono e morirono, tutti nel periodo di pochissimi giorni, 29 casi di tifo pellagroso.

il valore della classica reazione fenolica nella ricerca dei tossici pellagrogeni; come osservo con piacere ch' egli ora non insiste più oltre sulla questione principale delle nostre divergenze nell' etiologia della pellagra, vale a dire, sull' origine extra-parassitaria dei tossici pellagrogeni da lui prima con tanta abilità e ardore sostenuta, riferendosi egli sempre ora a tossici contenuti nella spora o nel micelio del parassita. Solo mi dispiace che il Gosio a contributo di questa teoria nostra e del Di Pietro porti oggi come nuovi dei fatti (p. es. che le spore perdono il loro potere tossico germogliando) da noi da tre anni circa sostenuti e sui quali il Besta di recente, nel lavoro tanto citato dal Gosio stesso, è ritornato con nuove esperienze.

Volendo ora concludere in base ai fatti più importanti da me osservati in questi ultimi anni sul ciclo biologico dei Penicilli verdi, e suffragati da un numero così notevole di osservazioni, da rendere quasi indiscutibile il valore delle nostre affermazioni, dirò che noi dovremo in avanti considerare, assai probabilmente, come patogene tutte la varietà di questi ifomiceti, potendo essi attraversare dei periodi più o meno lunghi di attività tossica, come possono attraversare dei periodi più o meno lunghi durante i quali appaiono assolutamente, o quasi, sprovviste di ogni proprietà di elaborare dei tossici in qualsiasi epoca dell' anno.

Durante i periodi di attività tossica, di durata per ora ancora indeterminata, questi ifomiceti possono produrre alternativamente, ora dei principî tossici di natura eccitante e convulsivante, ora dei principî tossici di natura deprimente e paralizzante.

I periodi di attività tossica dei Penicilli sono caratterizzati da un alternarsi di fasi di attività massima e minima che sono in rapporto colle stagioni dell' anno.

Nelle nostre condizioni climatiche durante la primavera e l' autunno questi ifomiceti di solito raggiungono il massimo di tossicità; mentre durante l'inverno e i mesi più caldi dell'estate raggiungono il minimo di tossicità e possono diventare perfino innocui.

Queste fasi di attività tossica massima e minima, che sono in rapporto colle stagioni dell' anno, sono pure assai di sovante accompagnate da modificazioni notevoli dei principali caratteri fisiologici del parassita e specialmente dei colori tipici e caratteristici del feltro e della superficie inferiore della patina [1].

---

## LAVORI CITATI NEL TESTO

Ceni 1. - Veleni degli Aspergilli *Fumigatus* e *Flavescens* e loro rapporti colla pellagra (In collabor. col Dott. Besta). *Rivista Sperimentale di Freniatria* Vol. XXVIII. F. IV. 1902. Ueber die Toxine von *Aspergillos Fumigatus* und A. *Flavescens* und deren Beziehungen zur pellagra *Centralbl. f. Algemeine Pathologie u. Pathologische Anatom.* XIII. Bd. 1902.

Id. 2. - Sulle proprietà patogene del *Penicillum Glaucum* nell' etiologia della pellagra. *Id.* 1903.

[1] In una prossima nota vedremo come oltre gli Aspergilli e i Penicilli, esistano altre specie di Ifomiceti dotati di proprietà tossiche e caratterizzati pure da un alternarsi di fasi biologiche presso a che uguali a quelle qui sopra descritte.

Ceni 3. - I Penicilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra. (In collaborazione col Dott. Besta). *Id.* Vol, XXIX, f. 1903.

Id. 4. - Le proprietà tossiche dell' *Aspergillus Fumigatus* in rapporto colle stagioni dell' anno. *Zieglers Beiträge zur patol. Anatomie u. zur. allegem. Pathologie* 1904. Vedi anche: *Rivista sper. di Freniatria* Vol. XX. F. I. 1904.

Id. 5. - Nuove ricerche sulla pellagra nei polli. *Riv. sper. di Freniatria* Vol. XXX. 1904.

Id. 6. - Die pathogen Eigenschaften des *Aspergillus Niger* mit Bezug auf die Genese der pellagra. (In Collabor. col Dott. Besta) *Ziegler's Beiträge zur patologischen Anatomie u. z. allgemeine Pathologie;* 37. Band; 1904. Vedi anche: Le proprietà patogene dell' *aspergillus niger.* ecc, *Riv Sper. di Fren.* Vol. XXX. 1904.

Id. 7. - Le proprietà tossiche di alcuni ifomiceti in rapporto colle stagioni e col ciclo annuale dell' endemia pellagrosa. *Atti dell' XI. Congresso della Società Freniatrica Italiana;* Genova 1904. Vedi anche *Rivista pellagrologica italiana*: 1904.

Id. 8. - Potere patogeno dell' *Aspergillus Ochraceus* e suo rapporto coll'etiologia e patogenesi della pellagra. *Rivista sper. di Fren.* Vol. XXXI 1905.

Id. 9. - Di alcuni caratteri biologici dei penicilli in rapporto colle stagioni e col ciclo annuale della pellagra. *Atti del III. Congresso della Società Italiana di patologia.* (Roma Aprile, 1905). *Lo sperimentale.* (*Archivio di biologia norm. e pat.*) 1905. Vedi anche *Rivista pellagrologica*, 1905.

Id. 10. - Nuovi concetti sull' etiologia e cura della pellagra. Conferenza tenuta alla Reale Società Italiana d' Igiene. Milano 16 Aprile 1905. *Giornale della R. Società Italiana d' Igiene.* N. 2. 1905.

Id. 11. - Di una nuova specie di *Aspergillus Varians* e delle sue proprietà patogene in rapporto coll' etiologia della pellagra. *Riv. sper. di Fren.* Vol. XXXI. 1905.

## SPIEGAZIONE DELLA TAVOLA.

Le figure riproducono al naturale le principali variazioni avvenute nei colori tipici delle patine delle tre prime varietà di *Penicillum Glaucum* sopra descritte osservate durante il 1904 e il 1905 nelle varie loro fasi di attività tossica.

Germi coltivati su liquido Raulin.

Le date qui sotto esposte e annesse al numero delle singole figure della tavola corrispondono all' epoca in cui fu riprodotta la patina e ne fu provato il potere tossico del parassita; mentre le lettere poste accanto indicano gli effetti ottenuti negli animali coll' iniezione degli estratti e che, come nella tabella riassuntiva intercalata nel testo, hanno il significato seguente:

T. effetti di un tossico di natura eccitante e tetanica.

D. effetti di un tossico di natura paralizzante e deprimente.

O. nessun fenomeno di intossicamento (parassita innocuo).

Varietà I. Fasi di attività tossiche in rapporto colle stagioni dell' anno.

*Fig. 1.* 27 Maggio 1904. = D.
*Fig. 2.* 1 Ottobre 1904 = D
*Fig. 3.* 9 Febbraio 1904 = O.
*Fig. 4.* 25 Agosto 1905 = T.

Varietà II. Fasi di attività tossica in rapporto colle stagioni dell' anno.

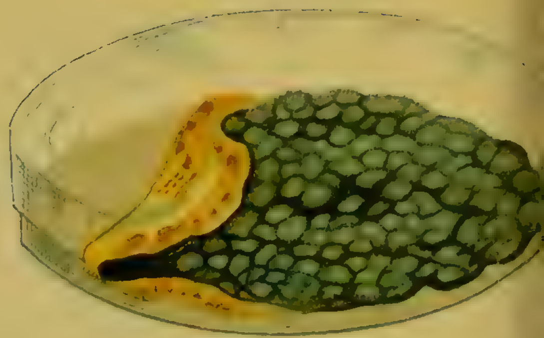
*Fig. 5.* 25 Maggio 1904 = T.
*Fig. 6.* 16 Dicembre 1904 = O.
*Fig. 7.* 6 Aprile 1905 = O.
*Fig. 8.* 1 Giugno 1905 = T.

Varietà III. Fasi di attività tossica indipendenti dalle stagioni dell' anno

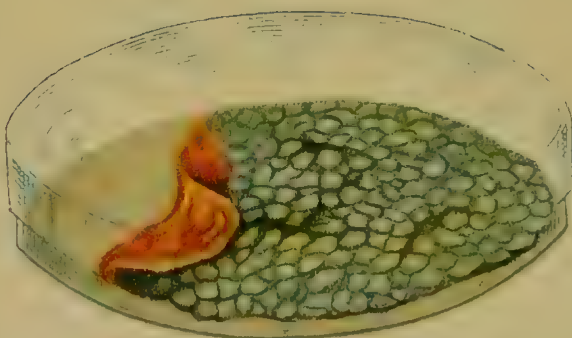
*Fig. 9.* 4 Maggio 1904 = O
*Fig. 10.* 22 Novembre 1905 = T.

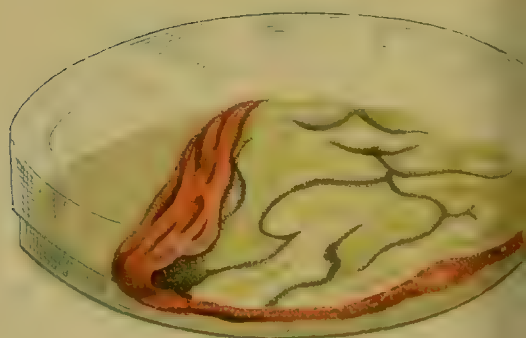
---

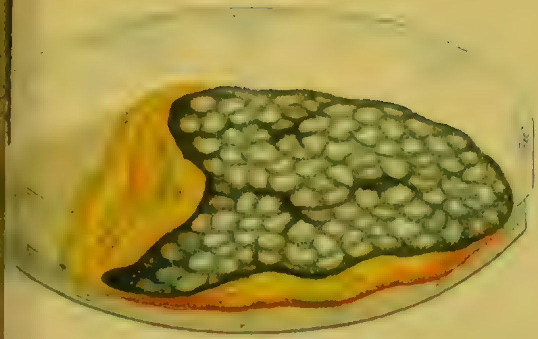


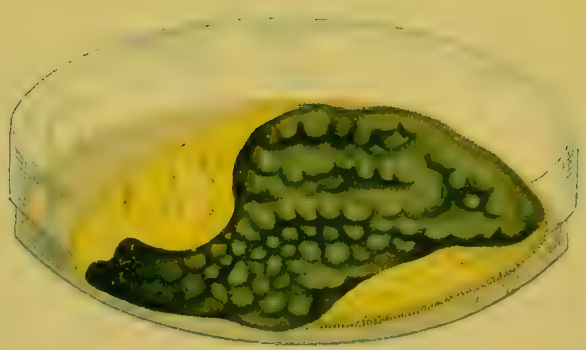


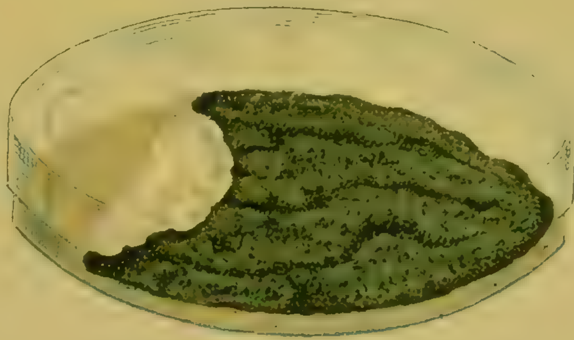


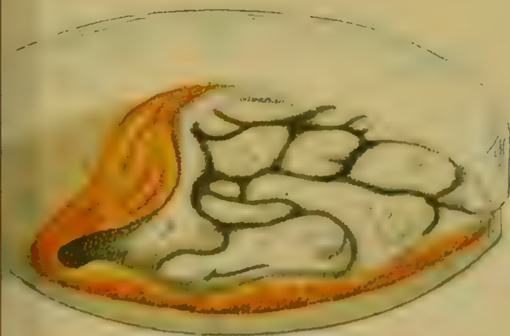


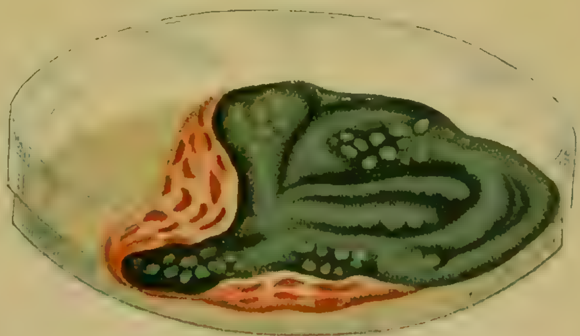












Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

PROF. A. TAMBURINI

IN UNIONE AI PROF.RI

C. GOLGI E. MORSELLI A. TAMASSIA E. TANZI



La **Rivista** si pubblica in **fascicoli trimestrali.**

**PREZZO DI ASSOCIAZIONE**

Per l'Italia **L. 20** Per l'Estero **L. 24.**

Un fascicolo separato costa **L. 5,00.**

Le domande di associazione devonsi dirigere alla *REDAZIONE DELLA RIVISTA DI FRENIATRIA, PRESSO L' ISTITUTO PSICHIATRICO, S. MAURIZIO, REGGIO-EMILIA.*

S'intende continuata l'associazione per l'anno venturo, quando non è disdetta un mese innanzi alla fine dell'anno

Di ogni pubblicazione scientifica interessante il giornale, di cui sia inviata copia alla Redazione, sarà dato annunzio nel bollettino bibliografico.

I reclami per fascicoli mancanti debbono esser fatti entro un trimestre.

La Rivista accorda in dono agli autori 50 copie dei loro scritti; per le copie in più si metterà a loro carico la sola spesa di tiratura e carta.

Ai Librai si accorda lo sconto del 10 per cento.

L'associazione nei paesi esteri, che hanno aderito all'accordo postale di Vienna del 1892, può esser fatta anche presso i rispettivi Uffici postali e in tal caso il prezzo annuo d'associazione è di L. 20.




DOTT. C. CENI

# DI ALCUNE NUOVE MUFFE VELENOSE

## in rapporto coll' etiologia della pellagra

*Estratto dagli Atti della Società Italiana di Patologia*
IV Riunione in Pavia - seduta del 4 Ottobre 1906



PAVIA
TIPOGRAFIA E LEG. COOPERATIVA
1907



Dott. C. Ceni    Reggio Emilia

## Di alcune nuove muffe velenose in rapporto coll' etiologia della pellagra.

Mio scopo è di esporre ora brevemente il risultato di alcune ricerche in corso sul potere patogeno di due nuove specie di muffe da me isolate dalle farine sia di *mais*, sia di *frumento*, raccolte in famiglie di pellagrosi appartenenti la massima parte alle provincie di Reggio Emilia e di Bergamo.

Sono muffe, che non appartengono a nessuna delle due specie di ifomiceti da me fin qui studiate, cioè che non appartengono nè ai penicilli, nè agli aspergilli. La prima di queste che fu riscontrata in quantità piuttosto limitata in campioni di farine di *mais* della montagna reggiana, presenta molti caratteri botanici delle *Isarie*.

Questa ha un feltro di color verde cupo intenso e fu riscontrata, ripeto, in quantità piuttosto scarsa e limitata nei campioni di farine raccolti esclusivamente nella vallata del comune di Villaminozzo della provincia reggiana.

La seconda specie ha invece molti caratteri botanici dei *Citromiceti*, descritti da Wehmer, e fu riscontrata in quantità assai abbondante nei campioni di farine, specialmente di frumento, raccolti nella parte piana della provincia di Bergamo.

Le varietà di questa ultima specie furono diverse e presentano un feltro che va dal grigio ferro scuro al cinereo.

Queste muffe, che già formano oggetto di studio da circa due anni, dal punto di vista botanico hanno presentato, come già ebbi ad osservare nei Penicilli e negli

Aspergilli, delle notevoli variazioni nei loro caratteri fisiologici e più propriamente nel color del feltro e nell' intensità dell' odore tipico da loro emanato; variazioni che qui pure furono riscontrate in rapporto, se non costante, certo frequente, colle diverse stagioni dell'anno e colle loro proprietà patogene, come vedremo fra breve.

La prima specie suddetta (Isaria ?), p. es., nella primavera ed estate 1905 ha presentato sempre un feltro di color verde cupo ed ha emanato un odore nauseante tutto suo speciale e intensissimo; mentre nell' inverno successivo crebbe assumendo ora un color verde assai pallido, ora un color giallo limone chiaro, anche se tenuta nella stufa, mantenendosi sempre pressochè inodora. Nella primavera ed estate 1906 il colore del feltro e l' odore tipico ricomparvero di nuovo, sebbene alquanto attenuati.

Dalle figure, che qui presento e che riproducono al vero le patine di questo parassita nelle varie fasi dell'anno, abbiamo un' idea abbastanza esatta delle variazioni dei colori del suo feltro.

Un altro carattere botanico, riscontrato in queste due specie di muffe e che merita ancora la nostra attenzione, perchè in rapporto pure assai di frequente colle stagioni dell'anno e col potere patogeno, ci è dato dai cambiamenti, spesso profondi, che avvengono nella forma del parassita stesso.

Per dare un' idea di questo polimorfismo delle muffe in discorso, fenomeno del resto già noto in botanica, mi limito qui pure a presentare alcune tavole che riproducono al vero le due specie suddette nelle loro diverse fasi e forme a seconda dei periodi dell' anno, in cui furono studiate.

Il polimorfismo colpisce specialmente gli apparecchi della riproduzione e più precisamente gli apparecchi conidiiferi (riproduzione per spore esogene).

Nelle due specie di muffe in discorso questi apparecchi, che sono tipici durante quelle stagioni dell' anno che costituiscono le condizioni di vita esteriore più favorevoli primavera, estate e autunno), durante l' inverno invece vanno deformandosi al punto da perdere del tutto o quasi i loro caratteri morfologici, fino a diventare irriconoscibili.

Durante queste fasi la riproduzione per spore esogene diventa assai scarsa e predomina quella per spore endogene, che durante la primavera invece è piuttosto limitata.

Questo rapporto tra polimorfismo e stagioni dell' anno deve essere considerato naturalmente mantenendo costante il mezzo nutritivo; giacchè, come è già noto in botanica, il medesimo fenomeno si può ottenere artificialmente in qualsiasi epoca dell' anno cambiando i mezzi di coltura.

Per ciò che riguarda il potere patogeno di queste muffe, dirò ch' esse presentarono, come gli Aspergilli e i Penicilli, dei periodi di massima e di minima tossicità in rapporto colle varie stagioni dell' anno. Il periodo di tossicità massima coincise per la più parte dei campioni colla primavera inoltrata, coll' estate e coll' autunno 1905; mentre invece durante l'inverno 1905-906 quasi tutti i campioni si presentarono atossici. Nella primavera inoltrata e nell' estate 1906 alcuni dei suddetti campioni riacquistarono completamente la loro tossicità tipica; mentre altri si mantennero ancora atossici, pur presentando un normale e rigoglioso sviluppo.

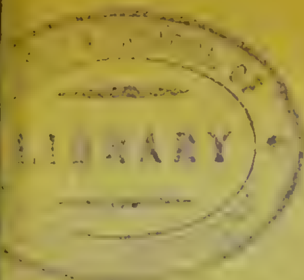
Altri campioni infine nella primavera ed estate 1906 non solo si mantennero sprovvisti d'ogni proprietà tossica, ma andarono incontro ad un evidente e progressivo stato di attenuazione; di modo che, non ostante i continui trapianti, finirono per perdere anche tutto, o quasi, il potere di germogliare.

I tossici elaborati da questi parassiti infine furono co-

stantemente a carattere *deprimente* e *paralizzante* e raggiunsero in alcuni casi un grado di intensità così elevata, che l'estratto d' una patina (Thindal) bastò per uccidere un cane di oltre 20 Kg. di peso nel periodo di 5-10 ore.

Tossici di carattere eccitante e convulsivante per ora almeno non furono isolati da questi parassiti.

Mi riservo a studio completo di riferire a lungo sui risultati definitivi anche di queste mie ricerche.




DOTT. C. CENI

# SULLE MODIFICAZIONI DEI CARATTERI FISIOLOGICI

DEI

# Penicilli verdi in rapporto colla loro proprietà tossica

*Estratto dagli Atti della Società Italiana di Patologia*

IV Riunione in Pavia - seduta del 4 Ottobre 1906



PAVIA

TIPOGRAFIA E LEG. COOPERATIVA

1907




Dott. C. Ceni — Reggio Emilia

## Sulle modificazioni dei caratteri fisiologici dei Penicilli verdi in rapporto colla loro proprietà tossica.

Voglio ora dire delle modificazioni che ho osservato in alcuni caratteri fisiologici dei Penicilli verdi durante il loro ciclo biologico annuale e il loro rapporto coll'attività tossica del parassita stesso. Mi riferisco qui a tre fatti principali e che risultano bene assodati dalle mie osservazioni, cioè: al modo più o meno rigoglioso di svilupparsi di questi parassiti, alle variazioni che avvengono nei colori tipici del feltro e della superficie inferiore delle loro patine, e al loro modo di comportarsi rispetto alla proprietà che hanno di elaborare dei principii fenolici nelle varie stagioni dell' anno.

I. Questi parassiti coltivati a temperatura ambiente nelle nostre condizioni climatiche e sopra un mezzo nutritivo costante (liquido di Raulin) non sempre nelle stagioni dell'anno presentano un modo identico di svilupparsi. Nelle migliori condizioni di sviluppo di solito crescono rapidamente e rigogliosi con sporificazione completa al 3°-4° giorno e formano nella capsula, in cui vengono coltivati, una patina completa fin da principio, la quale rimane di solito di uno spessore piuttosto piccolo, assumendo l'aspetto come di una pellicola sottile e alquanto friabile. Altre volte invece crescono lentamente in modo da sporificare solo dopo 6-8-20 e più giorni, e non arrivano quasi mai a costituire una patina completa, che occupi, cioè, tutta la superficie del mezzo nutritivo su cui si sviluppa. Questa patina è di spessore 5-6 volte maggiore della prima, è assai meno friabile

del solito e assume un aspetto mucilaginoso caratteristico, che si direbbe proprio delle forme attenuate e che degenerano. Ora il primo modo di svilupparsi, e che costituirebbe il tipo più normale, corrisponde di solito alla primavera e all'autunno; mentre il secondo tipo, l'anormale, corrisponderebbe di preferenza all'estate e più ancora all'inverno.

Non sempre però questo alternarsi di fasi di sviluppo massimo con fasi di sviluppo minimo costituisce un fenomeno costante nelle singole varietà botaniche di questi parassiti; giacchè ne esistono di quelle che, facendo eccezione alla regola, possono svilupparsi in modo rigoglioso, non solo nella primavera e nell' autunno, ma anche nell' inverno e nell' estate. Nell' estate poi sono assai più numerose che nell' inverno le varietà che fanno eccezione alla regola suddetta.

Al periodo di sviluppo rigoglioso corrisponde di solito la fase di attività tossica massima del parassita; mentre al periodo di sviluppo anormale corrisponde di solito la fase di attività minima. Anche questo rapporto non è però sempre costante; giacchè si possono osservare germi completamente atossici nel periodo di loro massimo sviluppo, come si possono osservare dei germi dotati di tossicità talvolta ancora discreta anche in un periodo di sviluppo minimo.

II. I colori tipici del feltro e quelli della superficie inferiore della patina cambiano pure di solito e notevolmente nelle varie epoche dell'anno, in cui il parassita viene coltivato, e anche queste variazioni sono assai di sovente in rapporto colla sua attività tossica, sebbene pure in modo non costante.

In termini generali durante l' attività tossica minima, cioè nell' estate e più ancora nell' inverno, i colori del feltro diventano più sbiaditi del solito, perdono la loro tipica tonalità e presentano una speciale tendenza ad assumere un

colore unico grigio-biancastro; di modo che le singole varietà botaniche finiscono per presentare un aspetto pressochè uniforme. La superficie inferiore della patina in questi periodi assume invece tinte più cariche del solito; quelle bianche cretacee, p. es., diventano di color bruno sporco; quelle di color giallo-arancio diventano persino di color rosso-scuro, feccia di vino, ecc.

Nei periodi di attività tossica massima, invece (primavera e autunno), tanto il feltro che la superficie inferiore della patina presentano delle tinte vive e tipiche per ogni singola varietà.

Non sempre però, come dissi, queste variazioni dei colori caratteristici delle varietà botaniche dei Penicilli verdi corrispondono ai vari periodi della loro attività tossica; osservandosi anche delle varietà che mantengono quasi invariati i loro colori tipici per tutto l' anno, pure presentando un alternarsi di fasi tipiche di tossicità massima e minima nelle varie stagioni; come si possono osservare altre varietà che presentano le suddette variazioni dei colori, pur rimanendo invece atossiche per tutto il periodo di un anno e anche più.

Il rapporto tra le variazioni dei colori caratteristici delle singole varietà botaniche e il loro potere tossico, se costituisce quindi un fatto assai frequente, non è però costante.

Le tavole che presento e che riproducono fedelmente le tinte di alcune varietà di Penicilli verdi nei vari periodi dell' anno, ci danno un' idea abbastanza esatta di questo fenomeno.

III. Per ciò che riguarda le variazioni che durante l' anno avvengono nella proprietà che molti Penicilli verdi posseggono di elaborare dei principii fenolici che reagiscono al cloruro di ferro, mi limito qui ad esporre alcuni dati,

dai quali sarà pure facile dedurne l' importanza scientifica e pratica.

Anzitutto dei miei 61 campioni di Penicilli verdi, tutti patogeni, come già dissi fin da principio, durante un periodo di osservazione di 3 anni, 39 hanno presentato la suddetta proprietà biochimica, mentre questa non fu mai riscontrata negli altri 22 campioni, ripeto, pure patogeni.

Stando quindi alle nostre molteplici osservazioni i Penicilli verdi potrebbero esser divisi, pel momento almeno, in varietà fenoliche e varietà afenoliche.

Ecco ora in breve quali furono i rapporti osservati tra questa variazione fenolica e le proprietà tossiche dei parassiti in discorso:

1). Al gruppo di Penicilli che rimasero fin qui afenolici appartengono 9 campioni, che diedero durante tutto il periodo di osservazione esclusivamente dei tossici di natura deprimente e paralizzante (D); mentre gli altri 13 campioni diedero alternativameute, ora dei tossici di natura eccitante e tetanizzante (T), ora dei tossici di natura deprimente e paralizzante (D). Finora quindi tra i Penicilli afenolici non furono riscontrate delle varietà dotate esclusivamente di proprietà tossiche eccitanti e convulsivanti.

2). Al gruppo di Penicilli fenolici appartengono invece sia dei campioni che durante il periodo di osservazione elaborarono alternativamente ora dei tossici di natura (T), ora dei tossici di natura (D); sia dei campioni che elaborarono esclusivamente o tossici di natura (T), o tossici di natura (D). I campioni di questo gruppo però elaborarono prevalentemente tossici di natura (T) e non di raro l' intensità del tossico fu riscontrata in rapporto diretto colla quantità dei prodotti fenolici. Non si tratta però affatto anche qui di un rapporto costante. Non di rado, anzi, si ebbe a notare il fatto inverso, cioè, una produzione massima di

principii di natura (T) in rapporto con una produzione minima di principii fenolici. Qualche volta, infine, la tipica reazione al cloruro di ferro si è osservata in parassiti che elaborarono esclusivamente dei tossici di natura (D); come pure la si ebbe a osservare in parassiti durante lunghi periodi di atossicità completa.

Concludendo dunque, se non esistono dei rapporti costanti e diretti tra la proprietà di elaborare dei tossici specifici e il modo più o meno rigoglioso di svilupparsi del fungo e le diverse variazioni dei colori del feltro e della superficie inferiore della patina; meno ancora esistono rapporti costanti e diretti tra la suddetta proprietà di elaborare dei tossici e quella di elaborare dei principii che reagiscono al cloruro di ferro.


LIBRARY

Dott. C. Ceni — Reggio Emilia

## Ulteriori ricerche sul ciclo biologico dei Penicilli verdi in rapporto colle stagioni dell'anno e colla pellagra.

Recentemente, in una nota riassuntiva, esponevo il frutto di oltre 2 anni (1904-1905) d'osservazioni sul ciclo biologico di 61 campioni di Penicilli verdi (Rivista sperim. di Freniatria - Vol. XXXII, 1906) e venivo anzitutto alla conclusione che tutte le numerose varietà di Penicillum glaucum debbono essere probabilmente considerate patogene, perchè tutti i campioni e varietà da me studiati s'erano mostrati tali. Varietà, che si erano mantenute innocue per più mesi e per più di un anno, avevano infatti in seguito acquistato le loro proprietà patogene tipiche; come invece altre varietà, rimaste patogene per un anno e più, diventarono in seguito innocue.

Riguardo alla natura dei tossici elaborati, concludevo che, pure contrariamente a quanto mi lasciavano supporre i miei studi preliminari, questi parassiti non possono più essere divisi in varietà con tossici dotati di potere deprimente e paralizzante (D) e in varietà con tossici dotati di potere eccitante e tetanizzante (T). La diversa natura del tossico era apparsa in rapporto, non più con varietà di parassiti, ma con fasi biologiche speciali dei medesimi; di modo che la massima parte di loro possono dare alternativamente ora dei tossici D, ora dei tossici T, a seconda appunto della fase in cui si trovano.

Le ricerche ulteriori, eseguite fino a tutto Agosto 1906 sui medesimi parassiti, confermarono pienamente quanto sopra e io mi permetto qui insistere ancora una volta su

questi nuovi fatti, per me di massima importanza nell'etiologia della pellagra, giacchè le forme cliniche diverse ed opposte di questa malattia possono così avere una razionale interpretazione, avvalorata da quanto si osserva di molto simile in altri capitoli della tossicologia e precisamente nell'avvelenamento pei cosidetti funghi velenosi, nel quale pure i sintomi possono assumere carattere diverso ed opposto anche in seguito all' ingestione di una medesima specie di fungo raccolto in epoche e località diverse.

Scopo principale di questa mia comunicazione però è di richiamare l'attenzione sul ciclo biologico di questi parassiti e precisamente sulle diverse fasi della loro attività tossica e sulle proprietà che hanno di elaborare alternativamente dei tossici di natura diversa e opposta; sembrandomi di vedere in questi nuovi fatti delle prove d' un valore non indifferente a sostegno della loro importanza etiologica nella pellagra.

Porto il risultato ormai di circa 3 anni di esperienze eseguite su circa 700 animali e con estratti alcoolici ottenuti da 61 campioni di Penicillum glaucum, metodicamente studiati nelle varie stagioni dell'anno.

**A)** *Fasi di attività tossica in rapporto alle stagioni dell'anno.* — In termini generali posso affermare che i risultati delle osservazioni eseguite dopo l' ultima mia comucazione in proposito, eseguite, cioè, dal Novembre 1905 in poi, non sono che una piena conferma dei primi, infatti il periodo di attività tossica in 3 anni di osservazioni coincise, per la massima parte dei 61 campioni di Penicilli verdi studiati, colla primavera e coll' autunno; mentre il periodo di tossicità minima coincise generalmente coll' inverno e coll'estate.

Questo, ripeto, in termini generali, stando al complesso dei risultati delle esperienze eseguite nei diversi periodi dell'anno.

La dimostrazione più evidente di queste fasi di attività tossica massima e minima la si ha specialmente confrontando i risultati delle esperienze eseguite nell' inverno e nella primavera, durante le quali stagioni, come pure ebbe a riscontrare recentemente il dott. Otto nei laboratori del compianto prof. Ziegler in Freiburg i. Br., (Zeitschrift f. klin. Medizin, Bd. 59 H. 2.4), si può frequentemente passare dallo stato di completa innocuità del germe (sia se cresciuto a temperatura ambiente, sia se cresciuto a temperatura artificiale che corrisponda al suo optimum di sviluppo) allo stato di sua massima tossicità.

Più difficile riesce invece la dimostrazione di queste fasi durante l' estate e l' autunno, riuscendo di solito in queste stagioni meno accentuate le diverse gradazioni dei tossici in discorso. Solo nell' estate del 1905 (Luglio e Agosto), in cui la temperatura dei nostri laboratori raggiunse 38°-39° e persino 40°, si ebbe a notare nei parassiti uno affievolimento tale del loro potere tossico, da poterlo paragonare a quello che abitualmente si osserva durante l' inverno. Ciò non fu facile invece a constatare nell'estate del 1904 e in quello del 1906, che decorsero però con temperatura più mite.

Questo rapporto tra le diverse fasi di attività tossica massima e minima colle stagioni dell'anno lo dobbiamo però dedurre, ripeto ancora una volta, dal complesso delle osservazioni; giacchè, stando ai risultati dei singoli casi, si potrebbe non di raro giungere a conclusioni anche contraddittorie. Si tratta di casi che fanno eccezione alla regola, ma che debbono pur esser ricordati, se non altro per non ingenerare confusioni in chi si accingesse a studi di controllo. Così dirò p. e. che mentre alcune varietà hanno presentato questa legge biologica in rapporto colle stagioni dell'anno durante il primo anno di osservazione (1904), nel-

l'anno susseguente invece si mantennero di un potere tossico quasi costante, presentando almeno delle variazioni assai poco marcate. Altri campioni invece presentarono il fatto opposto, cioè, nel primo anno le variazioni nel grado della tossicità invernale e primaverile, p. e., erano state assai poco sensibili; mentre negli anni susseguenti (1905-1906) risultarono evidentissime, anche facendo sviluppare, il parassita, durante l'inverno, a una temperatura costante e equivalente a quella del suo optimun.

Altre varietà invece rimasero innocue per un lungo periodo di un anno e più e solo in seguito acquistarono le loro proprietà tossiche; come infine delle varietà, che avevano conservato il loro potere tossico quasi invariato per un anno e più, rimasero poi negli anni successivi atossiche in tutte le stagioni pur presentando un normale e rigoglioso sviluppo.

Anche ai periodi di massima e di minima tossicità, a cui accennai più sopra, si dovrà dare una giusta interpretazione, dando alla parola un significato non troppo ristretto, e sarebbe errore se si volesse considerarli entro limiti di tempo ben circoscritti e determinati. Se nell'inverno si ha, p. e., in generale il minimo di attività tossica di questi parassiti, tuttavia è bene che si sappia che talvolta questo minimo si raggiunge nei mesi di Novembre e Dicembre; come il massimo di attività che, come dissi, corrisponde di solito alla primavera, in taluni casi si è visto coincidere p. e. coi mesi di Febbraio e Marzo, e poi scomparire del tutto, o quasi, durante l'Aprile e il Maggio.

Le variazioni che si osservano in proposito tra varietà e varietà, fra campione e campione, sono talvolta così svariate e marcate che oggi sarebbe, secondo me, presso che un assurdo pretendere trarre delle deduzioni d'indole generale in una simile questione, limitando le osservazioni a

un numere esiguo di parassiti, come p. e. fece anche di recente lo Stürli (Ueber die Aetiologie der Pellagra. Gesellschaft deut. Naturforscher etc. - Verhand. 1905).

Se dai risultati delle nostre numerose ricerche appare ora evidentemente dimostrato che l'attività tossica dei Penicilli, analogamente a quella degli Aspergilli, nelle nostre condizioni climatiche va soggetta a notevoli variazioni che sono in rapporto colle diverse stagioni dell' anno, risulta tuttavia ancora evidente dalle stesse nostre ricerche che altri fattori, indipendenti sempre dal substrato nutritivo, su cui si sviluppano i parassiti, e indipendenti ancora dalle stagioni dell'anno possono pure influire sulla suddetta attività tossica.

Basterà a tale proposito ricordare quanto accennai poc' anzi, che non di raro, cioè, parassiti rimasti innocui per un periodo di un anno e più, acquistarono in seguito le loro tipiche proprietà tossiche, come viceversa altri che erano rimasti tossici per un anno e più si presentarono in seguito perfettamente innocui, pur vegetando sempre rigogliosi e sopra un medesimo mezzo colturale. Sulle cause di queste lunghe fasi di atossicità del parassita indipendenti dalle stagioni dell' anno, non oso ancora pronunciarmi per insufficienza di dati. Solo richiamo su di esse per ora la speciale attenzione degli studiosi, sembrandomi di un' importanza singolare.

B) *Variazioni della natura dei tossici in rapporto colle stagioni dell' anno.* — Già dissi più sopra che dalle nostre ricerche è risultato nel modo più evidente che anche i Penicilli sono capaci di produrre alternativamente ora dei tossici di natura eccitante e tetanizzante (T), ora dei tossici di natura deprimente e paralizzante (D). Riassumo ora in breve i rapporti che sono apparsi tra questi due tipi di tossici di azione diversa e opposta e le diverse stagioni dell' anno.

Anzitutto debbo però premettere che la facoltà di elaborare alternativamente dei tossici di varia natura (T e D) non pare sin qui che costituisca un carattere costante di tutti i Penicilli verdi, sebbene sia stato osservato assai di frequente. Di 61 campioni, infatti, durante il lungo periodo di osservazione, finora 28 soltanto hanno presentato la suddetta proprietà di variare nella natura dei tossici da loro elaborati; mentre gli altri 33 campioni elaborarono sempre un sol tipo costante di tossico.

Di questi ultimi, che chiamerò, pel momento, parassiti con tossici di natura costante, 19 diedero puramente del tossico T e 14 diedero invece puramente del tossico D. Anche nei penicilli con tossici di natura variante si è poi infine notato che nei singoli casi predomina sempre e in modo sorprendente uno dei due tipi di tossici suddetti; di modo che queste variazioni nell'elaborazione dei tossici sembrerebbe più che altro costituire qualche cosa di anomalo, che viene a perturbare il decorso normale del ciclo biologico di questi parassiti, che parrebbero destinati a produrre un tossico costante e a tipo unico.

Quali siano le cause che possono influire nel determinare nel parassita queste variazioni nella natura del tossico non è per ora facile il dirlo. Posso a ogni modo affermare fin d'ora ch'esse devono essere indipendenti dal mezzo nutritivo, su cui si sviluppa il germe, almeno nel nostro caso, ma che devono dipendere dall'ambiente, in cui questo si sviluppa, e essere in rapporto ancora, assai probabilmente, colle stagioni dell'anno e colle condizioni climatiche del paese. Solo così potrei infatti spiegare la coincidenza di queste variazioni nel potere metabolico dei parassiti coi cambiamenti delle stagioni stesse, da me osservate tanto di frequente.

In quanto riguarda poi il vario tipo dei tossici elabo-

rati in rapporto alle stagioni, intendo qui far notare che i tossici di tipo D prevalgono in genere nelle stagioni fredde ; cosicchè è massimamente nell' inverno che noi vediamo Penicilli che dal tossico di tipo T passano al tossico di tipo D nelle sue diverse gradazioni. Viceversa dicasi del tossico tipo T, il quale con una abbastanza notevole prevalenza appare nella primavera ed estate piuttosto che nelle altre stagioni. Dico con notevole prevalenza , perchè anche qui si tratta d' un fatto tutt' altro che costante, avendo perfino osservato dei casi, sebbene assai rari , nei quali la produzione del tossico tipo T coincideva prevalentemente invece con un mese invernale.

Concludendo , a me pare che i risultati di queste ricerche sui Penicilli vengano nel loro complesso a comprovare in modo abbastanza eloquente l' enorme influenza che le stagioni dell' anno vengono ad esercitare sul loro metabolismo e in modo particolare sulle proprietà ch' essi posseggono di elaborare dei tossici specifici. Le stagioni avrebbero poi un' influenza non solo sull' attività tossica del parassita, determinando così delle fasi di maximum e di minimum di produzione tossica, che corrispondono alle diverse fasi annuali di recrudescenza e di remissione dell' endemia pellagrosa ; ma avrebbero ancora un' influenza, non ancora ben determinata, sulla natura degli stessi tossici elaborati.

---

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. I.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# DI UN ASPERGILLO BRUNO GIGANTE

## E DELLE SUE PROPRIETÀ TOSSICHE

## IN RAPPORTO COLLA PELLAGRA

DEL

**Dott. CARLO CENI**
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. I.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SUL POTERE TOSSICO DI ALCUNE MUFFE GERMANICHE CRESCIUTE IN ITALIA

Contributo allo studio dell' influenza del clima nell' etiologia della pellagra

DEL

**Dott. CARLO CENI**
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.



*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

( 616. 01 / 86 )

A queste ricerche fui indotto in modo particolare dai risultati apparentemente in contraddizione coi nostri, ottenuti di recente dallo Sturli [1] e più ancora dall' Otto [2] sul potere tossico delle muffe pellagrogene.

Lo Sturli sperimentò in Vienna, presso il Prof. Neusser sopra campioni di *Penicillium glaucum* provenienti dal mio Laboratorio e da quello del Gosio e trovò gli estratti alcoolici di questi ifomiceti sempre innocui, anche se fatti con enorme quantità di germi; mentre gli stessi in Italia si presentarono dotati di proprietà tossiche convulsivanti tipiche.

L'Otto nei Laboratori del Prof. Ziegler in *Freiburg i. Br.* studiò le proprietà tossiche di 2 campioni di *Aspergillus fumigatus* da me inviatigli e di altri 7 campioni dello stesso ifomiceta da lui isolati dall' atmosfera e da farine di cereali del luogo.

I 2 campioni italiani presentarono proprietà tossiche convulsivanti tipiche nella prima metà del Giugno 1904; ma poi divennero perfettamente innocui durante l' inverno successivo e precisamente nei mesi di Novembre, Dicembre e Gennaio. Alla fine del Marzo 1905 però questi due campioni riacquistarono la loro primitiva tossicità; mentre i 7 campioni nazionali si mantennero costantemente privi d' ogni proprietà tossica.

[1] Sturli. Ueber die Atiologie der Pellagra. *Gesellschaft Deutscher Naturforscher u. Arzte.* Verhandlungen 1905.

[2] Otto. Ueber die Giftwirkung einiger Stämme von *Aspergillus fumigatus* und *Penicillium glaucum* nebst einigen Bemerkungen über Pellagra. *Zeitschrift f. klinische Medizin,* 59. Bd, H. 2/4.

Lo stesso A. sperimentò sopra 14 campioni di *Penicillium glaucum*, due dei quali gli furono pure da me inviati, e gli altri 12 erano stati ancora da lui isolati in Germania.

Dai 2 campioni italiani questo A. potè estrarre dei tossici di azione convulsivante nei mesi estivi del 1904 e 1905; mentre dai 12 campioni nazionali non ottenne nei suddetti mesi che dei tossici d' azione deprimente e in quantità assai scarse.

In quanto ai risultati negativi che ottenne lo Sturli, pur seguendo in tutto la tecnica nostra sia nella coltivazione dei germi, sia nell' estrazione dei tossici, siccome l' A. non fa alcun cenno all' epoca precisa in cui vennero eseguite le esperienze; mi limito qui a richiamare l' attenzione sulle condizioni climatiche diverse in cui egli ha sperimentato, di fronte a quelle di Roma e di Reggio-Emilia, nelle quali città gli stessi ifomiceti si erano invece dimostrati forniti di tipiche proprietà tossiche.

Pei risultati dell' Otto invece due ipotesi si possono fare: o trattasi di varietà botaniche diverse, cioè, varietà tossiche e varietà atossiche, provenienti da paesi diversi, le prime dall'Italia e le seconde dalla Germania; oppure trattasi d' un' influenza enorme che il clima diverso dei due suddetti paesi può esercitare sull' attività tossica delle muffe in discorso. In quest' ultimo caso però, più che a un'azione immediata del clima esercitata sul fungo nel momento in cui vegeta, bisognerebbe pensare a un' azione a lunga scadenza e, in parte almeno, trasmissibile a parecchie generazioni fino a dare alla muffa un' impronta di un apparente carattere botanico. Così si spiegherebbe come ifomiceti tedeschi coltivati in Germania, nelle condizioni climatiche cioè, alle quali da tempo erano adattati, anche nelle stagioni più favorevoli per la produzione dei tossici, si siano conservati sempre perfettamente atossici (*Aspergillus fumigatus*) o abbian prodotto soltanto lievissime quantità di tossici (*Penicillium glaucum*); mentre le medesime specie d' ifomiceti adattati a un clima più favorevole, al clima italiano, abbiano potuto produrre dei tossici tipici se anche trasportati in Germania.

La conoscenza della vera causa di questi fatti si imponeva a ogni modo sotto ogni punto di vista sia scientifico, sia pratico, per varie ragioni che riguardano il problema della pellagra; ed è alla ricerca di questa che mirano appunto le attuali mie ricerche, rivolte anzitutto a stabilire il modo di comportarsi delle muffe pellagrogene nella produzione dei tossici, quando da un clima sfavorevole vengono portate in un altro più favorevole.

A tale scopo nella scorsa estate recatomi in varie località della Germania del Nord e precisamente in *Halle* a. s. (Prov. Sachsen), in *Aarup* (Prov. Schlegwig), e in *Jastrow* (Prov. Westpreussen) nelle quali fu sempre esclusa nel modo più assoluto la pellagra, isolai dall' atmosfera alcune muffe e nello stesso tempo raccolsi in recipienti sterilizzati vari campioni di farina di frumento e di segale di accertata provenienza locale. Da queste farine furono in seguito isolate delle muffe, spesso in quantità assai considerevoli, sulle quali, unitamente alle prime, rivolsi le mie ricerche, sperimentandone in Italia, nel mio laboratorio, il potere di tossicità.

Riferisco qui per ora i risultati avuti con 17 campioni di *Penicillium glaucum*, bastando essi più che mai per risolvere la questione qui sopra propostami.

Le ricerche furono eseguite, secondo il solito, estraendo i tossici dalle patine del germe, cresciute su liquido Raulin e in camere Thyndal, mediante l' alcool a caldo, e provandoli poi sugli animali (cani) con iniezioni intraperitoneali. Tali ricerche furono ripetute due volte alla distanza di circa tre mesi, per vedere nello stesso tempo anche l' influenza delle stagioni sulle muffe germaniche.

La prima esperienza fu fatta con germi sviluppatisi sulla fine di Settembre e sul principio di Ottobre; la seconda fu fatta coi medesimi germi sviluppatisi verso la fine di Novembre e nella prima metà di Dicembre.

Nel Settembre e Ottobre la massima parte dei penicilli crebbero a temperatura ambiente assai rapidamente e rigogliosi; in modo che al 4° e 5° giorno già presentarono un' abbondantissima sporificazione; pochi di essi invece crebbero più lentamente impiegando 7-8 giorni per raggiungere un grado di sporificazione eguale a quello dei primi.

Dei 17 campioni in discorso, 2 soli si presentarono innocui, sprovvisti di ogni proprietà tossica; così che l' estratto di una e anche di due patine non determinò negli animali alcun fenomeno di intossicamento. Questi due penicilli erano tra quelli cresciuti più rapidamente e più rigogliosi.

Gli altri 15 campioni invece, dei quali alcuni cresciuti rapidamente e altri lentamente, si presentarono tutti forniti di proprietà tossiche così accentuate, che di ciascuno di essi bastò l' estratto di una sola patina per uccidere un cane del peso di 12-13 Kg. nel periodo di 18-24 ore.

I caratteri d' intossicamento degli animali anche qui però non furono uniformi, ma di due tipi perfettamente opposti: 12 cani morirono infatti coi più gravi e caratteristici fenomeni dei tossici pellagrogeni d' azione eccitante e convulsivante; mentre gli altri 3 morirono coi fenomeni gravi e caratteristici dei tossici d' azione deprimente e paralizzante.

Nella seconda prova, in quella del Novembre e Dicembre, furono sperimentate le proprietà tossiche degli stessi penicilli sia cresciuti alla stufa a 19-20°, sia a temperatura ambiente.

Alla stufa questi crebbero in generale rigogliosi e con una rapidità pressochè eguale a quella impiegata per svilupparsi a temperatura ambiente nell' autunno; di modo che 6-7 giorni dopo la seminagione sul liquido Raulin si potevano considerare già pervenuti a una sporificazione massima. Il color del feltro apparve però di solito un po' più sbiadito che nei mesi precedenti e qualche patina si presentò più legnosa di prima. Due campioni crebbero però più lentamente, impiegando 10-12 giorni a raggiungere una sporificazione completa.

Gli estratti alcoolici delle patine iniettati nei cani nelle proporzioni suddette (l' estratto d' una patina per ogni 12 Kgr. di animale) diedero risultati alquanto diversi dei primi. Degli estratti dei 17 campioni ora infatti soltanto quelli di 8 apparvero tossici; mentre quelli degli altri 9 campioni si comportarono come sostanze del tutto o quasi innocue. Degli 8 campioni con risultati positivi poi, 7 diedero dei tossici d' azione eccitante e convulsivante, ma in generale notevolmente meno intensi di quelli ottenuti nell' autunno. Tre cani soltanto presentarono dei fenomeni gravi con tremori e convulsioni tetaniformi e morirono in 19-26 ore; mentre gli altri 4 non presentarono che dei lievi tremori senza convulsioni nelle prime 12-18 ore e in seguito si ristabilirono completamente.

L' estratto dell' ottavo campione che diede risultati positivi determinò infine nell'animale dei lievi fenomeni di depressione, che 24 ore dopo l' iniezione erano pure del tutto scomparsi.

La diversità dei risultati ottenuti in questa seconda prova del potere tossico dei penicilli in questione, in confronto di quelli ottenuti nell' autunno, è quindi più che evidente e dimostrativa; e a me non rimane che a far rilevare il notevole affievolimento dell' attività tossica di questi ifomiceti germanici avvenuta durante l' inverno, per quanto essi siano cresciuti sul medesimo

mezzo colturale usato nell'autunno e a una temperatura costante che corrisponde al loro *optimum* di sviluppo.

Risultati pressochè identici si ebbero sperimentando nel Novembre e Dicembre coi germi coltivati alla temperatura ambiente, che oscillò fra un massimo di 9° e un minimo di 1°. Tutti i penicilli crebbero non meno rigogliosi che a temperatura costante della stufa; colla diversità soltanto che ora impiegarono 12 giorni per raggiungere una sporificazione completa. I campioni che cresciuti alla stufa si erano mostrati forniti di proprietà tossiche convulsivanti, non solo apparvero dotati delle stesse proprietà tossiche anche a temperatura ambiente, ma queste furono in qualche caso di grado superiore alle prime; giacchè 5 dei suddetti campioni determinarono con gravi fenomeni la morte degli animali nel periodo di 18-27 ore. Lo stesso dicasi del campione che cresciuto alla stufa era apparso dotato di proprietà tossiche deprimenti, che tale apparve ancora a temperatura ambiente; mentre gli altri 9 campioni si mantennero sempre del tutto innocui.

Richiamo qui in modo singolare l' attenzione sull'uniformità dei risultati ottenuti con questi penicilli nordici nelle due esperienze invernali eseguite a una temperatura costante di 19°-20° e alla temperatura ambiente di 9°-1°; giacchè mentre essa viene a dimostrare come realmente negli ifomiceti in questione durante l' inverno avvenne una notevole diminuzione della loro attività tossica riscontrata nell' autunno, viene altresì a provare nel modo più evidente come la temperatura non basti per se stessa a spiegare la diversità dei risultati ottenuti nelle due suddette stagioni.

Su quest' ultima questione del resto ebbi già occasione di intrattenermi a proposito anche dell' attività tossica di ifomiceti isolati in Italia in rapporto colle stagioni dell'anno; per cui non credo che si debba qui attribuire al caso attuale un' eccessiva importanza alla produzione di tossici sia a medie, sia a basse temperature.

Dalle nostre esperienze risulta quindi che anche i penicilli isolati in Germania, i quali sperimentati *in sito*, secondo le ricerche di Otto, si presentano in qualsiasi stagione dell' anno sempre atossici o quasi, se vengono trasportati in un paese pellagrogeno, come l' Italia, possono acquistare la proprietà di elaborare dei tossici a caratteri tipici, sia d' azione eccitante e convulsivante, sia di azione deprimente e paralizzante,

analogamente ai penicilli d'origine italiana, come noi già abbiamo dimostrato [1]. In secondo luogo dalle ricerche qui riassunte risulta che i penicilli germanici trasportati in Italia non solo acquistano le suddette proprietà tossiche pellagrogene; ma che in questa loro attività tossica acquisita risentono assai probabilmente l'influenza delle stagioni dell'anno a un dipresso come i penicilli italiani [2]. Infatti mentre 15 di essi su 17 hanno presentato un massimo di tossicità verso la fine di Settembre e sul principio di Ottobre (1906); nel principio di Dicembre dello stesso anno, coltivati sia alla temperatura costante di 19°, sia alla temperatura ambiente, 8 di essi soltanto appaiono dotati di proprietà tossiche, e queste per di più sono generalmente di un'intensità inferiore a quelle presentate nell'autunno.

Senza fermarmi qui a far risaltare l'importanza che questi nuovi reperti possono avere nell'etiologia della pellagra; mi basti far osservare per ora come essi sieno più che sufficienti per dare una giusta interpretazione ai risultati pressochè negativi ottenuti dall'Otto in Germania con ifomiceti colà isolati. Quei risultati ora non possono certo esser messi in rapporto con varietà botaniche speciali del paese, come poteva sembrare; ma non possono esser messi in rapporto che colle speciali condizioni climatiche del paese stesso.

In una prossima nota, in cui mi propongo di esporre i risultati di ricerche in corso anche su altre muffe nordiche, vedremo ancor meglio la grande importanza che ha il clima di un paese sulla etiologia e diffusione di questa malattia.

---

1 Ceni. Sul ciclo biologico dei penicilli verdi in rapporto coll' endemia pellagrosa e con speciale riguardo alla loro attività tossica nelle varie stagioni dell' anno. *Rivista sper. di Freniatria* Vol. XXXII. 1906 — Vedi anche: *Zieglers Beiträge zur pathol. Anatomie u. zur allgem. Pathologie.* B. XXXIX. 1906.

2 Id. Idem.

Archivio Italiano per le malattie nervose e mentali

# RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA

E MEDICINA LEGALE DELLE ALIENAZIONI MENTALI

DIRETTA DAL

PROF. A. TAMBURINI

IN UNIONE AI PROF.RI

C. GOLGI E. MORSELLI A. TAMASSIA E. TANZI



La **Rivista** si pubblica in **fascicoli trimestrali.**

**PREZZO DI ASSOCIAZIONE**

Per l'Italia **L. 20** Per l'Estero **L. 24.**

Un fascicolo separato costa **L. 5,00.**

Le domande di associazione devonsi dirigere alla *DIREZIONE DELLA RIVISTA DI FRENIATRIA.*

S'intende continuata l'associazione per l'anno successivo, quando non è disdetta un mese innanzi alla fine dell'anno

Di ogni pubblicazione scientifica interessante il giornale, di cui sia inviata copia alla Direzione, sarà dato annunzio nel bollettino bibliografico.

I reclami per fascicoli mancanti debbono esser fatti entro un trimestre.

La Rivista accorda in dono agli autori 50 copie dei loro scritti; le copie in più sono a loro carico.

Ai Librai si accorda lo sconto del 10 per cento.

L'associazione nei paesi esteri, che hanno aderito all'accordo postale di Vienna del 1892, può esser fatta anche presso i rispettivi Uffici postali e in tal caso il prezzo annuo d'associazione è di **L. 20.**

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. I.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SUL POTERE TOSSICO
# DI ALCUNE MUFFE GERMANICHE
## CRESCIUTE IN ITALIA



Contributo allo studio dell' influenza del clima nell' etiologia della pellagra

DEL

**Dott. CARLO CENI**
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
Vol. XXXIII. Fasc. I.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# DI UN ASPERGILLO BRUNO GIGANTE

## E DELLE SUE PROPRIETÀ TOSSICHE

## IN RAPPORTO COLLA PELLAGRA

DEL

**Dott. CARLO CENI**
DIRETTORE DEI LABORATORI SCIENTIFICI



*(Con una Tavola)*

REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*



Trattasi di un aspergillo di notevoli dimensioni che, nelle mie numerose ricerche sull' atmosfera di ambienti abitati da pellagrosi e sulle farine di cereali usufruite dalle famiglie di questi infelici, ho riscontrato soltanto una volta nel Luglio 1905 e in proporzioni assai limitate nei campioni di due farine, una di *mais* e l' altra di frumento, provenienti da una delle località meno infette da pellagra del Comune di Reggio-Emilia, cioè dalla frazione di S. Maurizio.

L' ifomiceta ha un feltro di color bruno scuro, color di cioccolata, che ricorda molto alcune specie di aspergilli bruni descritti dagli autori, specialmente l'*Aspergillus Wenti;* ma che da tutti questi si distingue pei suoi caratteri morfologici e sopratutto per le sue dimensioni.

Riassumo qui pertanto i suoi caratteri botanici principali.

Premetto che questo aspergillo, studiato metodicamente, si può dire mese per mese, per un periodo di oltre un anno, ha presentato delle variazioni nei caratteri botanici, che per la loro natura e pel loro rapporto colle stagioni, meritano una speciale considerazione.

Le variazioni da me osservate si riferiscono sia ai caratteri fisiologici, sia a quelli morfologici. Per ciò che riguarda i caratteri fisiologici dirò anzi tutto che il feltro [1], che fu costantemente bruno scuro durante l'estate e autunno 1905 (*fig. 1* e *3*), durante

[1] Intendesi sempre il colore del fungo giovane sviluppatosi di recente e sopra un mezzo colturale costante (liquido Raulin), che in questo caso era stato preparato in abbondanza nell' estate 1905 e conservato in appositi recipienti per essere usufruito volta per volta.

l' inverno successivo apparve ora di un color giallo verdastro, da ricordare quello dello zolfo (*fig. 2*), ora invece di color giallo terreo. Notisi che nella stagione invernale non crescendo da noi il germe a temperatura ambiente, fu coltivato alla stufa a una temperatura che corrispondeva al suo *optimum*. Nella primavera, nell' estate e parte dell' autunno 1906, fino a tutto ottobre, il germe crebbe ancora a temperatura ambiente e il suo feltro riacquistò il color dell' anno precedente, cioè il color cioccolata. La superficie inferiore della patina rimase invece quasi sempre di un color bianco cereo e solo nel settembre e ottobre 1906 assunse un color giallo ocra chiaro.

Il germe fu quasi sempre inodoro, tranne nell'autunno 1906, nel quale le patine emanarono un intenso odore aromatico speciale. Anche l' aspetto generale della patina subì notevoli modificazioni contemporaneamente a quelle suddette. Nel 1905 il fungo in tutto il periodo in cui crebbe a temperatura ambiente conservò un aspetto sempre assai rigoglioso: la patina era assai grossa, misurando 1-2 cent., legnosa e presentava un feltro lanuginoso costituito da un fondo biancastro, sul quale si elevavano liberi in aria dei rari e lunghi steli pure biancastri, ma terminanti con una cappocchia assai grossa di color bruno scuro e assai facilmente distinguibile a occhio nudo (*fig. 1*). Durante tutto il periodo invernale invece il fungo crebbe meno rigoglioso, con una patina più sottile e con un feltro d' aspetto polverulento che ricordava assai bene uno strato di tabacco da naso, sul quale era affatto impossibile distinguere a occhio nudo gli apparecchi conidiferi, perchè di dimensioni assai ridotte (*fig. 2*). Nella primavera, estate e autunno 1906 il fungo riacquistò il suo aspetto rigoglioso primitivo con apparecchi conidiferi assai sviluppati; colla differenza che ora questi erano di dimensioni un po' più piccole di quelli dell' anno precedente; essi erano però ora anche così numerosi e così compatti tra di loro da impedire di scorgere il fondo biancastro del feltro (*fig. 3*).

Tali modificazioni in rapporto colle stagioni dell' anno furono però più o meno intense a seconda della natura del terreno colturale: sulla patata p. e. il fungo crebbe generalmente rigoglioso e con formazione di grossi apparecchi conidiferi anche nell' inverno.

Le variazioni morfologiche riguardano specialmente l' apparecchio conidifero. L' ifomiceta cresciuto sul liquido Raulin

nelle sue migliori condizioni di sviluppo rispetto all' ambiente (nella primavera inoltrata, nell' estate e in parte dell' autunno) presentò costantemente un apparecchio conidifero assai voluminoso, con una grossa vescicola tondeggiante, separata nettamente dallo stelo e ricoperta da corti e tozzi sterigmi primari che si suddividevano in parecchi sterigmi secondari, esili e più corti dei primi (*fig. 4 A*). Cresciuto sullo stesso liquido Raulin, ma in condizioni esteriori di sviluppo più sfavorevoli, cioè, nell'inverno, se anche tenuto alla stufa, mentre conservò sempre inalterata la forma tipica della vescicola terminale, questa era però di dimensioni assai più ridotte del solito e appariva ora generalmente sormontata da sterigmi semplici, piuttosto esili e corti, assolutamente mancanti di sterigmi secondari (*fig. 4 B*). Gli apparecchi conidiferi con sterigmi secondari in questo periodo furono osservati assai di raro.

I conidii invece si mantennero in qualsiasi epoca dell' anno lievemente ovoidali, disposti a catena e con una superficie ricoperta da piccole punte che dànno loro un aspetto granuloso (*fig. 4 C*).

Gli ifi conservarono pure caratteri costanti, cioè, apparvero sempre con pareti liscie e incolori. Incolori sono sempre stati anche la vescicola terminale dello stelo e gli sterigmi; mentre i conidii, mantenendo la forma e le dimensioni invariate, apparvero colorati ora in bruno scuro, ora in giallo chiaro, a seconda del colore che assumeva il feltro.

L' ifomiceta non fonde la gelatina che assai lentamente e lentamente coagula il latte, ridisciogliendo poi il coagulo; rende alcalino il liquido Raulin.

Cresce bene sui mezzi comuni di coltura (liquido Raulin, patate, pane bianco, polenta), e non presenta la reazione fenolica al cloruro di ferro nè col metodo Gosio nè con quello del Di-Pietro.

Il suo *optimum* di temperatura è di 18°-20° e non cresce che assai malamente sotto i 10° e sopra i 25°. Non presenta aschi e periteci.

Dimensioni. — La capocchia formante l' apparecchio conidifero misura un diametro che va da 500 $\mu$ a 1-2 mm. Gli ifi fruttiferi lunghi 3-10 mm., larghi 30-45 $\mu$; gli ifi sterili possono raggiungere 2-4 cent. di lunghezza. La vescicola terminale dello stelo ha un diametro di 90-140 $\mu$. Nei casi in cui gli sterigmi si suddividono in altri secondari (corrispondenti al genere

*Sterigmatocystis*) gli sterigmi primari misurano 35-45 $\mu$ di lungh. e 25-30 $\mu$ di largh.; i secondari misurano 18-20 $\mu$ di lungh. e 10-12 $\mu$ di largh.

Nei casi con gli sterigmi semplici (corrispondenti al genere *Aspergillus* propriamente detto) questi misurano 18-20 $\mu$ di lungh. e 12-15 di largh.

Proprietà tossiche. — Le proprietà tossiche di questo fungo furono studiate esclusivamente mediante estratti alcoolici di patine cresciute, come il solito, su liquido Raulin nelle comuni capsule Thyndal. L' estrazione del tossico fu eseguita con apparecchi a ricadere e le esperienze furono ripetutamente eseguite durante il suddetto periodo d'osservazione nell'ordine cronologico qui sotto esposto. Come animale d'esperimento usufruii qui esclusivamente del cane, tenendo conto della sua squisita sensibilità a questi tossici.

Esperienza I. - *10 settembre 1905.* - Due patine di 13 giorni, cresciute rapidamente a temperatura ambiente e con aspetto assai rigoglioso, ma con un feltro fornito di pochi apparecchi conidiferi (*fig. 1*).

Cane di 12500 gr. - Iniezione intraperitoneale di tutto il residuo dell'estratto alcoolico ripreso con 20 cmc di acqua. L'animale dopo pochi minuti è preso da vomiti, entra in seguito in un lieve stato di abbattimento generale; ma dopo 24 ore si può dire completamente ristabilito.

Esper. II. - *3 ottobre 1905* - Due patine di 19 giorni cresciute a temperatura ambiente e aventi l'aspetto eguale alle due precedenti (*fig. 1*).

Cane di 9 Kg. - Iniezione intraperitoneale di tutto l'estratto alcoolico ripreso con 22 cmc. di acqua. L' animale è preso da vomiti; entra presto in uno stato di depressione abbastanza notevole, con paresi generale; di modo che 3 ore dopo l' iniezione si sorregge e cammina malamente, barcollando. Ha frequenti scariche diarroiche nel primo e secondo giorno e rimane sitofobo. Al terzo giorno sembra alquanto risvegliato dal torpore in cui era caduto; cammina abbastanza bene e comincia a bere e a mangiare.

Al quarto giorno il suo stato migliora ancora e al quinto si può dire completamente ristabilito.

Esper. III. - *20 novembre 1905.* - In questo mese il fungo non cresce a temperatura ambiente e per ciò lo si fa sviluppare alla stufa a 19-20°.

Due patine di 17 giorni, cresciute più lentamente, meno rigogliose del solito e con un feltro di color giallo limone verdastro (*fig. 2*).

Cane di 7300 gr. - Iniezione di tutto il residuo dell'estratto alcoolico raccolto con 20 cmc. di acqua. L' animale non presenta alcun fenomeno di intossicamento.

Esper. IV. - *3 dicembre 1905.* - Due patine di 19 giorni, cresciute alla stufa e di aspetto eguale alle ultime due precedenti (*fig. 2*).

Cane di 8 Kg. - Iniezione di tutto l' estratto ecc. Nessun fenomeno di intossicamento.

Esper. V. - *30 febbraio 1906.* - Due patine di 20 giorni cresciute lentamente alla stufa, assai poco rigogliose, d' aspetto molto analogo a quello delle due ultime esperienze precedenti, ma con un feltro di un color giallo più scuro.

Cane di 9 Kg. — Iniezione di tutto il residuo dell' estratto raccolto con 22 cmc. d' acqua. L' animale presenta presto dei vomiti intensi che durano oltre due ore; entra in uno stato di grave depressione, si sorregge assai malamente ed emette continui guaiti di lamento cercando di comprimere il ventre al suolo. Ventre dolentissimo alla palpazione.

Il giorno seguente il cane è sempre abbattuto, sonnecchia di continuo e ha un respiro profondo; non emette più guaiti, ma ha sempre il ventre assai dolente alla palpazione. Scariche diarroiche frequenti e con strie di sangue; sitofobia

Al terzo giorno l' animale è sempre nelle stesse condizioni; ma al quarto è notevolmente migliorato. Esso appare risvegliato dal suo torpore; si sorregge e cammina abbastanza bene e beve abbondantemente. Nei giorni susseguenti il miglioramento continua; l' animale mangia, ma per circa due mesi rimane magro, d' aspetto cachettico e solo più tardi ritorna al suo peso primitivo.

Esper. VI. - *20 aprile.* - In questo mese il fungo cresce, sebbene ancora lentamente, anche a temperatura ambiente; per ciò si fa l' esperienza sia con patine cresciute alla stufa, sia con patine cresciute a temperatura ambiente.

*A.* Due patine di 18 giorni cresciute a temperatura ambiente, di aspetto abbastanza rigoglioso e con un feltro di color bruno scuro e avente abbondanti e grossi apparecchi conidiferi (*fig. 3*).

Cane di 7900 gr. - Iniezione di tutto l'estratto raccolto con 24 cmc. di acqua. L' animale ha vomiti continui per circa 3 ore di tempo; entra presto in un grave stato di abbattimento e di torpore; rimane accovacciato tenendo gli occhi chiusi e di tanto in tanto emette guaiti di lamento. Ha il ventre assai dolente alla palpazione, qualche scarica diarroica verso sera ed è sitofobo.

Il giorno susseguente all'iniezione l'animale è sempre assai depresso e sonnecchia. Stimolato si sorregge e cammina assai male, barcollante e cadendo spesso su di un lato come ubriaco. Il ventre è sempre dolente alla palpazione e le scariche diarroiche più frequenti. Al terzo giorno il cane è assai depresso; ma beve un po' d' acqua, che rimette però quasi subito dopo, commista ad abbondante muco giallo verdastro. Persiste la doloribilità al ventre e l' impossibilità a sorreggersi.

Al quarto giorno miglioramento notevole: l' animale mangia e beve senza aver vomito e può camminare assai meglio dei giorni precedenti. Nei giorni susseguenti il miglioramento continua e l' animale si può dire ristabilito dopo 25 giorni circa.

*B.* Due patine di 18 giorni cresciute rapidamente alla stufa e di aspetto e colore eguali alle due precedenti cresciute a temp. ambiente (*fig. 3*).

Cane di 8350 gr. - Iniezione di tutto l' estratto raccolto con 20 cmc di acqua. L'animale presenta gravi fenomeni di avvelenamento a carattere depressivo a un dipresso eguali a quelli dell' esperienza precedente e che durano per circa 4 giorni. In seguito migliora e si può dire ristabilito circa 20 giorni dopo l' iniezione.

Esper. VII. - *20 maggio* - Due patine di 19 giorni cresciute rapidamente a temperatura ambiente, rigogliose e con un feltro di color bruno tipico costituito di grossi apparecchi conidiferi (*fig. 3*).

Cane di 9250 gr. - Iniezione di tutto l'estratto raccolto con 20 cmc. di acqua. Fenomeni di grave intossicamento a carattere depressivo, come nell' ultima esperienza precedente. L' animale si rimette solo dopo un periodo di circa 40 giorni.

Esper. VIII. - *18 giugno.* - Due patine di 20 giorni cresciute rapidamente a temperatura ambiente; d' aspetto molto eguale a quelle del maggio, ma un pò meno rigogliose.

Cane di 6200 gr. - Iniezione di tutto l'estratto raccolto con 24 cmc. di acqua. L' animale non presenta alcun fenomeno d' intossicamento.

Esper. IX. - *12 luglio* - Due patine di 18 giorni cresciute a temperatura ambiente; d' aspetto presso a poco come le precedenti.

Cane di 12 Kg. - Iniezione di tutto l'estratto raccolto con 22 cmc. di acqua. Nessun fenomeno di intossicamento.

Esper. X. - *10 settembre.* - Due patine di 16 giorni cresciute rapidamente a temperatura ambiente, rigogliose e con un feltro sempre eguale a quello delle tre ultime esperienze (*fig. 3*). La superficie inferiore della patina che fin qui si era mantenuta di color bianco cereo, ora è invece di color giallo ocra chiaro. Le patine inoltre, che da un anno circa

erano sempre rimaste inodore, emanano un odore aromatico assai penetrante.

Cane di 8200 gr. – Iniezione di tutto l'estratto raccolto con 22 cmc. d'acqua. L'animale è preso da vomiti violenti ed entra presto in un così grave stato comatoso con rilasciamento generale di tutte le masse muscolari, che dopo due ore non può più affatto sorreggersi. Ha il ventre assai dolente alla palpazione, frequenti scariche diarroiche ed è sitofobo.

In queste gravi condizioni il cane rimane altri due giorni, durante i quali però i vomiti sono cessati.

Al quarto giorno l' animale sembra un pò migliorato e può sorreggersi, sebbene ancora malamente; beve dell' acqua per due volte durante la giornata, ma poi la rigetta quasi subito mista a catarro giallastro. Nei giorni susseguenti le condizioni del cane non accennano a migliorare, e questo muore 9 giorni dopo l' iniezione, rimanendo sempre sitofobo e in preda sempre a gravi fenomeni di depressione.

L' animale negli ultimi giorni presentò inoltre un continuo scolo di una materia fluida giallo-verdastra dal naso e dagli occhi; aveva inoltre un forte panno corneale con iniezione intensa della congiuntiva.

Autopsia: Congestione assai grave del peritoneo e delle pareti intestinali con abbondanti essudati fibrinosi aderenti alle pareti stesse dell'intestino e alla capsula del fegato. Numerosi focolai emorragici sotto la mucosa di tutto l' intestino, specialmente però del tenue, nel di cui interno abbondava del muco siero-sanguinolento.

Congestione intensa si osservò pure ai reni, al polmone; assai meno spiccata alla pia meninge. La sostanza cerebrale era invece edematosa e stasica.

Colture fatte in brodo dell' essudato peritoneale rimasero sterili.

Esper. XI. – *4 novembre.* – Due patine di 18 giorni, cresciute alla stufa e piuttosto lentamente hanno un aspetto assai meno rigoglioso di quelle del mese precedente, ma conservano un feltro di color bruno scuro.

Cane di 7 Kg. – Iniezione di tutto l' estratto raccolto con 25 cmc. d' acqua. L' animale ben presto si mette ad abbaiare disperatamente, cerca di comprimere il ventre contro il suolo e morde spesso la catena, apparendo evidentemente in preda a forti dolori. Questo quadro dura circa mezz'ora e in seguito l'animale entra in uno stato di lieve torpore, dal quale si risveglia rapidamente; di modo che dopo 5 ore si ristabilisce completamente.

Riassumendo vediamo anzi tutto che il sopra descritto aspergillo apparve dotato di principi tossici estraibili, e che questi inoculati nel cane si presentarono costantemente dotati d'un'azione paralizzante e deprimente. In secondo luogo vediamo che l' atti-

vità tossica di questo germe non fu costante in tutto il periodo di osservazione di oltre un anno, pur mantenendo invariato il terreno colturale; ma ha presentato notevolissime oscillazioni a seconda delle stagioni in cui fu studiata.

In quanto all' azione unicamente paralizzante e deprimente dei tossici isolati da questo ifomiceta, dopo quanto ho potuto dimostrare per l'*Aspergillus varians* [6] da me descritto e più ancora pei penicilli [7], intorno alla proprietà che hanno queste muffe di elaborare alternativamente tossici di natura biologica diversa e opposta, credo che non dovrà meravigliare se esso, in condizioni di clima diverso da quello in cui fu sperimentato o in qualsiasi altra condizione di sviluppo più o meno favorevole, di quelle in cui fu da me studiato, potrà elaborare anche dei tossici di azione eccitante e convulsivante. A ogni modo data la sua tendenza ad elaborare dei tossici a soli caratteri depressivi, è logico ammettere ch' esso, almeno qui da noi, debba esser considerato in rapporto etiologico specialmente colle forme croniche della pellagra, colle forme appunto con sintomi di depressione generale e non colle forme acute, caratterizzate, ripeto qui una volta ancora, da uno stato di eccitamento psicomotorio tutto speciale.

Insisto su questa influenza del clima sull' attività tossica delle muffe e sulla natura biologica dei tossici da loro elaborati, indipendentemente dal mezzo colturale; perchè essa, oltre che dalle mie numerose ricerche è stata confermata di recente anche da Otto [8] e da Paladino [9], per quanto quest' ultimo attribuisca ai suoi risultati un significato opposto. Il primo, infatti, ripetendo le mie ricerche in *Freiburg i. Br.* nei laboratori del Prof. Ziegler (1904-1905) con diversi campioni di *Aspergillus fumigatus* e di *Penicillium glaucum*, che presso di me si erano dimostrati dotati d' un' azione eminentemente convulsivante, trovò che cresciuti colà erano invece esclusivamente provvisti di tossici d' azione deprimente, pur usando egli il medesimo mezzo colturale da me adottato. Il secondo, controllando in Roma, nei Laboratori della Direzione di Sanità diretti dal Prof. Gosio, le proprietà tossiche del mio *Aspergillus varians*, concluse che il germe deve esser ascritto al gruppo degli ifomiceti con tossici ad azione tipicamente convulsivante, mentre da me questo parassita, nel periodo ormai di oltre due anni, apparve sempre dotato di tossici d' azione deprimente e solo nel Luglio 1905 diede tossici d' azione nettamente convulsivante.

Questo autore però, non dando alcuna importanza alle diverse condizioni climatiche nelle quali si sviluppò il parassita, riporta i risultati da lui ottenuti, ripeto, come dati decisivi contro i rapporti da me dimostrati tra l' attività tossica delle muffe e le stagioni; basandosi egli sul fatto che presso di lui questo aspergillo produsse dei tossici non solo nell'estate (giugno), ma anche nell' inverno e precisamente nel febbraio 1906. Conclude perciò che la causa che mi portò ad ammettere il suddetto rapporto colle stagioni dell'anno, non può attribuirsi che a errori di tecnica in cui io sarei incorso. A tale proposito mi permetto per ora soltanto di far notare come a questa conclusione non sono giunto in seguito ai soli reperti ottenuti col mio *Aspergillus varians*, come il Paladino sembra che voglia far credere, ma in base al complesso di numerosi risultati ottenuti sia sottoponendo polli a nutrizione di *mais* avariato per più anni [2], sia in seguito ai risultati avuti coll'estrazione di tossici da numerosi ifomiceti [3-4] e specialmente dall' *Aspergillus fumigatus* [1], isolato in varie stagioni per un lungo periodo di tempo, non che da 61 campioni di Penicilli [7] che studiai metodicamente e studio ancora pure da più anni. Le mie conclusioni che si fondano, come sempre dissi, sul complesso dei risultati ottenuti di un numero così considerevole di esperienze, confermate ora ampiamente dai reperti di Otto, non mi pare che possano perciò esser confutate con un'unica osservazione, eseguita per di più in condizioni tanto diverse da quelle nelle quali furono eseguite le mie ricerche.

Le eccezioni a una regola non potrebbero del resto infirmare il valore d' una legge biologica. Un bell' esempio lo abbiamo in proposito nel caso dell' ifomiceta che forma oggetto di questa memoria, il quale, per quanto nell' alternarsi delle sue fasi tossiche e atossiche cronologicamente non in tutto corrisponda ai risultati avuti dalla massima parte delle altre muffe fin qui studiate; pure per me, come vedremo fra breve, non rappresenta nel complesso dei risultati fornitici che una nuova riconferma dell' azione che esercitano le condizioni climatiche e le stagioni dell' anno sull' attività tossica dei parassiti vegetali. Questo ifomiceta infatti, che presenta proprietà tossiche di grado mediocre nei mesi di settembre e ottobre 1905, nei mesi successivi di novembre e dicembre diviene del tutto innocuo pur vegetando abbastanza rigoglioso se anche tenuto alla stufa e a un grado che corrisponde al suo *optimum*. In seguito, nel-

mese di febbraio 1906, pur crescendo ancora alla stufa, l'ifomiceta riacquista il suo potere tossico che mantiene quasi invariato nel suo grado anche nei mesi successivi di aprile e di maggio. Nel mese di giugno e luglio però di nuovo il germe perde ogni sua attività tossica e ridiviene innocuo; mentre poco dopo nel mese di settembre egli riacquista la sua tossicità e ora in modo più notevole del solito, per riperderla poi di bel nuovo nel novembre successivo.

Non credo necessario di insistere oltre sui particolari di questo alternarsi di fasi tossiche e di fasi atossiche di questo aspergillo, per dimostrare che anche qui siamo davanti a un fenomeno in rapporto esclusivamente colle condizioni dell' ambiente in cui egli si sviluppa, in poche parole, in rapporto colle stagioni dell'anno. Diversamente non credo possibile spiegare questo alternarsi di fasi, avendo, ripeto qui ancora, mantenuto scrupolosamente invariato il mezzo colturale (liquido Raulin), che in questo caso per di più, come già feci notare fin da principio, a scopo di evitare qualsiasi obbiezione, è stato preparato una volta tanto nel giugno 1905 e conservato in appositi recipienti per esser usufruito nelle singole esperienze.

Notisi infine che qui l' estrazione dei tossici fu fatta con apparecchi a ricadere e che perciò non si potrà tirare in campo neppure la questione della volatilità dei principi tossici; questione sollevata dal Gosio al recente Congresso pellagrologico in Milano, quale altra probabile causa d' errore che mi avrebbe portato a concludere per il rapporto tra la attività tossica delle muffe e le condizioni climatiche.

I fatti che risultano dalle esperienze che qui sotto riporto sono del resto in perfetta contradizione coll' ipotesi del Gosio sull' eccessiva volatilità dei tossici pellagrogeni.

Due patine di 7 giorni di un *Penicillium Glaucum* in stato di attività tossica convulsivante vengono bollite in 500 cmc. di alcool comune in apposito apparecchio distillatore e per un periodo di 1 ora e $^1/_2$, fino a distillare 300 cmc. dell' alcool impiegato. Evaporato questo alcool distillato, il suo residuo, ripreso con 24 cmc. di acqua, non dà traccia alcuna della reazione fenolica al cloruro di ferro ed inoculato nel peritoneo di un cane di 5200 gr. non presenta alcuna proprietà tossica.

Filtrato e evaporato invece l'alcool rimasto nel matraccio dell'apparecchio distillatore (200 cmc.), il suo residuo, ripreso con 24 cmc. di acqua, presenta una tipica reazione di color viola intenso al cloruro di

ferro (metodo di Pietro e metodo Gosio) e inoculato nel peritoneo di un cane di 9600 gr., provoca nell'animale il quadro classico dell'intossicamento che si ha coi tossici pellagrogeni d' azione eccitante e convulsivante. L' intenso tremore e le convulsioni frequentissime durano circa 7 ore di continuo e in seguito l' animale muore sotto un attacco tetaniforme.

La prova fu ripetuta bollendo quattro altre patine del medesimo *Penicillium* in 500 cmc. di alcool, protraendo ora l'ebollizione per un periodo di 2 ore, fino a distillare 400 cmc. dell' alcool adoperato.

I risultati furono perfettamente eguali ai primi, cioè: nessuna reazione fenolica e nessun potere tossico nel residuo ottenuto dai 400 cmc. di alcool distillato; reazione fenolica tipica e gravi fenomeni d'intossicamento a caratteri convulsivanti ecc. ottenuti col residuo dei 100 cmc. di alcool rimasti nel matraccio dell' apparecchio distillatore. Un cane di 14700 gr. inoculato colla metà di quest' ultimo residuo, muore infatti 9 ore dopo sotto i più tipici attacchi tetaniformi.

I risultati di queste esperienze sono quindi più che sufficienti per dimostrare quanto infondata sia l' obbiezione del Gosio basata sopra una pretesa eccessiva proprietà volatile dei tossici pellagrogeni. Se questi tossici, come risulta qui sopra, dopo 1 ora e $^1/_2$ e anche dopo 2 ore di ebollizione non si riscontrano nell' alcool distillato che corrisponde rispettivamente a circa due terzi e a quattro quinti di quello usufruito per l'estrazione dei medesimi; non sarà più certo possibile ammettere che questi tossici possano volatilizzare e in quantità tale da compromettere il risultato dell' esperienza, quando l' ebollizione della patina, fatta pure senza apparecchi a ricadere, venga limitata al tempo necessario per l' estrazione del tossico, vale a dire, a 25-30 minuti al più.

L' estrazione a caldo dei tossici pellagrogeni può esser quindi fatta, senza il pericolo di incorrere in gravi cause d' errore, anche in semplici matracci, senza speciali apparecchi a ricadere.

Ancora al suddetto congresso il Gosio avrebbe pure affacciata l'ipotesi di una probabile eccessiva diversità nel modo di reagire dei diversi animali ai tossici pellagrogeni, che potrebbe trarci in errore nello studio delle fasi di tossicità massima e minima, caratteristiche, secondo noi, del ciclo biologico delle muffe. Il suo assistente Dott. Paladino, nel lavoro sopra citato, pretenderebbe ora di aver in realtà dimostrata una sorprendente diversità nella reazione individuale degli animali a questi tossici, basandosi sui risultati avuti iniettando nel cranio di un piccione del siero di sangue di un cane che non aveva reagito a quantità notevoli di estratti penicillari.

Una diversità di reazione individuale, esagerata al punto che di due animali della stessa specie davanti a una dose pres-

sochè eguale di un tossico uno muore in breve tempo coi fenomeni di un grave intossicamento acuto caratteristico, mentre l'altro sopravive senza presentare alcun disturbo, come spesse volte abbiamo visto nelle nostre esperienze, costituirebbe un fenomeno quasi inesplicabile e nuovo in tossicologia. In quanto poi alla pretesa dimostrazione di questo fenomeno fatta dal Paladino, lascio al mio collaboratore Dott. Besta, che da tempo si occupa della questione della tossicità del sangue, il provare il grave errore in cui egli è incorso. Io mi limito in proposito a far notare, una volta ancora, quanto sia poco serio nelle scienze biologiche contrapporre il risultato di un' unica osservazione a conclusioni basate ormai su parecchie centinaia di esperimenti.

È a ogni modo degno di considerazione il fatto che nel caso attuale il parassita, mentre perde la sua attività tossica nel novembre e dicembre 1905, anche se coltivato a una temperatura artificiale che corrisponda all' *optimum* pel suo sviluppo, nelle stesse condizioni di temperatura artificiale riacquista poi la sua tossicità già nel mese di febbraio, per conservarla quasi inalterata tutta la primavera fino all' estate successiva. Ho voluto richiamare l' attenzione su questa particolarità, anzitutto per dimostrare che neppure la temperatura può essere considerata quale causa unica dell' intermittenza nell' attività tossica osservata, essendosi avuti qui appunto fasi tossiche e atossiche anche nei mesi d' inverno in cui il parassita, non crescendo a temperatura ambiente, fu tenuto a sviluppare a una temperatura costante nella stufa. In secondo luogo ho voluto insistere sulla ricomparsa della tossicità nel parassita già fin nel mese di febbraio, per dimostrare come questo possa essere considerato un caso tipico con fase tossica primaverile precoce; mentre il più delle volte, qui da noi, nelle muffe questa fase comincia coll'aprirsi della primavera stessa o a stagione già inoltrata.

Esempi di questa precocità, nella fase di tossicità primaverile, del resto già ne ebbi a osservare anche tra i penicilli, come dirò più a lungo a suo tempo, e specialmente in quelli che possono crescere abbastanza bene a temperatura ambiente anche nell' inverno.

Queste eccezioni alla regola invece che a infirmare la nostra tesi, non verrebbero quindi, secondo me, che a completare le nostre cognizioni sul ciclo biologico dei parassiti pellagrogeni.

D'altronde non mancano casi tipici di pellagra, non solo cronica, ma anche acuta, verificatisi anche nei mesi di febbraio o di marzo; mentre è risaputo che, da noi almeno, il periodo di massima recrudescenza di questa malattia di solito corrisponde alla primavera già spiegata.

La fase di attività tossica minima corrispondente alla stagione estiva sarebbe invece nel caso in questione molto tipica, essendo il germe rimasto perfettamente innocuo durante i mesi più caldi dell' anno, cioè, nel giugno e nel luglio; per quanto il suo sviluppo e aspetto anche in questo periodo non abbia presentato nulla di speciale.

Nel settembre 1906 invece, epoca che corrisponde al massimo grado di tossicità raggiunta dall' ifomiceta durante tutto il periodo di osservazione, riscontriamo delle modificazioni notevoli in alcuni dei suoi caratteri botanici. La superficie inferiore della patina che nelle altre epoche è sempre rimasta di un color bianco cereo, diviene, come già dissi fin da principio, di color giallo ocra chiaro e per di più il fungo, che è sempre stato inodoro, ora emana un odore aromatico speciale. Se poi trattisi di una semplice coincidenza di fenomeni o di rapporti intimi tra l'aumento del grado di tossicità e queste ultime variazioni dei caratteri botanici del germe, non lo saprei dire, essendosi tale fenomeno avverato una volta soltanto.

In termini generali però credo di poter affermare che anche in questo caso, come già feci notare per altre specie di aspergilli e pei penicilli, le variazioni che di solito si osservarono nell' aspetto generale del fungo, nel suo modo più o meno rigoglioso di svilupparsi, nel colore tipico del feltro e persino nella forma (*Sterigmatocystis* oppure *Aspergillus*), per quanto di frequente abbiano coinciso col suo stato di attività tossica massima o minima, pure non costituirono dei rapporti costanti [1].

[1] Sul polimorfismo delle muffe pellagrogene indipendente dal mezzo colturale, ma in rapporto colle condizioni esteriori più o meno favorevoli al loro sviluppo, in rapporto, voglio dire, colle stagioni dell' anno, già richiamai l' attenzione in due mie comunicazioni fatte di recente al III. Congresso Pellagrologico in Milano e al III Congresso di Patologia in Pavia, esponendo i risultati delle mie ricerche sul potere di tossicità di due nuove muffe da me non ancora bene classificate (Citramiceti ecc ?!)

Anche in quelle muffe il polimorfismo, come nell' ifomiceta in questione, era a carico specialmente dell' apparecchio conidifero; colla differenza che in quelle i cambiamenti morfologici avvenuti nell' apparato della riproduzione

Basti ricordare a tale proposito i risultati delle esperienze p. es. eseguite nel febbraio 1906, durante il quale il germe apparve tossico, non ostante che il suo aspetto generale e il color del suo feltro parlassero per uno stato di minore vitalità, di sviluppo imperfetto; al contrario di quanto si ebbe e notare nei mesi di giugno e di luglio, durante i quali esso risultò del tutto atossico, mentre presentavasi apparentemente coi caratteri tipici di un rigoglioso e normale sviluppo.

Ho richiamato l'attenzione anche su queste ultime particolarità, solamente perchè convinto che ogni nuova conoscenza in questa complicata questione della tossicità delle muffe costituisca un passo in avanti anche nello studio dell'etiologia della pellagra.

Ecco quindi quanto possiamo riassumere e concludere.

1. L'ifomiceta qui descritto, coltivato sopra un terreno di coltura costante, a seconda delle epoche dell'anno in cui fu studiato si presentò ora coi caratteri morfologici del genere *Sterigmatocystis*, ora con quelli del genere *Aspergillus*. La forma *Sterigmatocystis* pare che rappresenti quella più tipica, essendosi osservata assai piu di frequente della seconda e di preferenza nelle stagioni dell'anno più favorevoli allo sviluppo dell'ifomiceta a temperatura ambiente (primavera avanzata, estate e parte dell'autunno). La forma *Aspergillus* pare rappresenti l'atipica, essendosi questa osservata meno di frequente della prima e di preferenza nei periodi dell'anno più sfavorevoli per lo sviluppo naturale del fungo (parte dall'autunno, inverno e parte della primavera).

A questi cambiamenti di forma corrisposero di solito cambiamenti anche di altri caratteri botanici del fungo, specialmente nel colore del feltro.

2. L'ifomiceta fu isolato da farina di *mais* e di frumento provenienti da plaghe piuttosto scarsamente infette da pellagra ed ha dato dei tossici estraibili, di solito però meno attivi di quelli ottenuti da altri ifomiceti; per es. dall'*Asperg. fumigatus*.

3. I tossici per tutto il periodo di osservazione ebbero sugli animali costantemente un'azione evidentemente deprimente e paralizzante, senza provocare alcun fenomeno di eccitamento psicomotorio.

erano spesso così profondi da rendere il germe irriconoscibile ed erano rappresentati da forme atipiche che non hanno, io credo, alcun riscontro in botanica; mentre invece nel caso attuale noi non abbiamo che la riproduzione alternativa di due forme botaniche tipiche e ben distinte, ma che erano fin qui ritenute dalla massima parte degli autori come due generi di ifomiceti affatto diversi.

4. Il grado di tossicità dell'ifomiceta variò assai da un'epoca all' altra durante un periodo di oltre un anno di osservazione: fu mediocre nel settembre e ottobre 1905 e nullo nel novembre e dicembre successivi; dal febbraio al maggio 1906 ritornò mediocre; ridivenne nullo nel giugno e luglio successivi; ma poi nel settembre raggiunse il suo massimo e ritornò quasi nullo nel novembre.

---

## LAVORI CITATI.


1. Ceni. Le proprietà tossiche dell'*Aspergillus Fumigatus* in rapporto colle stagioni dell' anno. *Zieglers Beiträge zur patol. Anatomie u. zur allgem. Pathologie,* 1904. Vedi anche *Rivista sper. di Fren.* Vol. XXX F. I 1904.
2. Id. Nuove ricerche sulla pellagra nei polli. *Riv. sper. di Fren.* Vol. XXX 1904.
3. Ceni e Besta Die pathogenen Eigenschaften des *Aspergillus Niger* mit Bezug auf die Genese der Pellagra. *Zieglers Beiträge zur patologischen Anatomie u. z. allgemeine Pathologie;* 37° Band; 1904. Vedi anche: Le proprietà patogene dell' *Aspergillus Niger* ecc. *Rivista sper. di Freniatria* Vol. XXX 1904.
4. Ceni. Potere patogeno dell' *Aspergillus Ochraceus* e suo rapporto coll' etiologia e patogenesi della pellagra *Rivista sper. di Fren.* Vol. XXXI. 1905.
5. Id. Nuovi concetti sull' etiologia e cura della pellagra. *Giornale della R. Società Italiana d' Igiene.* N 2, 1905.
6. Id. Ueber eine neue Art von *Aspergillus Varians* und seine pathogenen Eigenschaften in Bezug auf die Ätiologie der Pellagra *Ziegler Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allg. Pathol.* XXXIX. Bd. 1906. Vedi anche: Di una nuova specie di *Aspergillus Varians* ecc.. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol XXXI.
7. Id. Ueber den biologischen Cyclus der grünen Penicillien in Bezug auf die Pellagra-endemie und mit besonderer Berücksichtigun ihrer toxischen Wirkung bei den verschiederen Iahreszeiten. *Ziegler Beiträge zur path. Anat.* XXXIX. Bd. 1906.
   Vedi anche: Sul ciclo biologico dei Penicilli verdi in rapporto coll' endemia pellagrosa ecc. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol XXXII 1906.
8. Otto. « Ueber die Giftwirkung einiger stämme von *Aspergillus fumigatus* und *Penicillum glaucum* nebst einigen Bemerkungen über pellagra ». *Zeitschr. f. Klinische Medizin.* Bd. 59; H. 2/4. 1906.
9. Paladino-Blandini. Tossici di ifomiceti. *Archivio di Farmacologia sperimentale e Scienze affini.* Anno V, Vol. V. 1906.


## Spiegazione della tavola.

*Fig. 1.* - Aspetto dell' ifomiceta, coltivato su liquido Raulin, conservato dal luglio all' ottobre 1905.

*Fig. 2.* - Aspetto dell' ifomiceta, coltivato su liquido Raulin, il più di sovente presentato dal novembre 1905 al febbraio 1906.

*Fig. 3.* - Aspetto dell' ifomiceta ecc. il più di sovente presentato dall' aprile all' ottobre 1906.

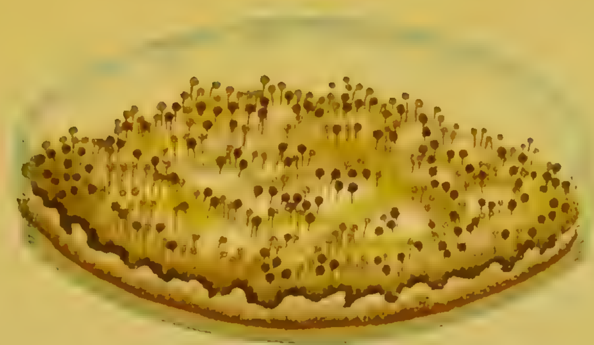
*Fig. 4.* Forme dell' apparecchio conidifero presentate dall' ifomiceta nelle varie epoche dell' anno.

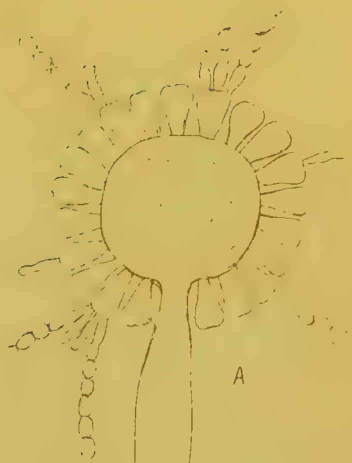
*A*) Forma del germe a tipo *Sterigmatocystis.*
*B*) Forma del genere a tipo *Aspergillus.*
*C*) Conidii. Ingrandimento di 1000 diam.

---

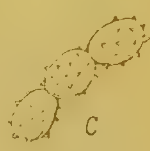

LIBRARY

1

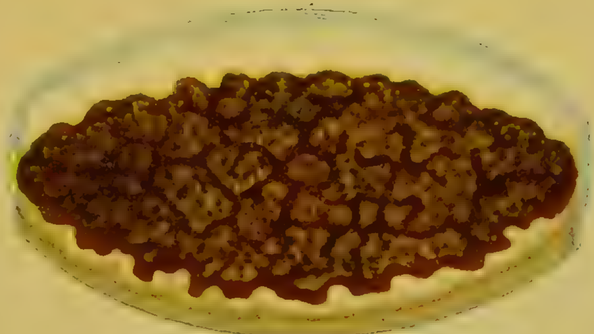


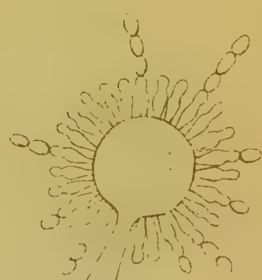



4

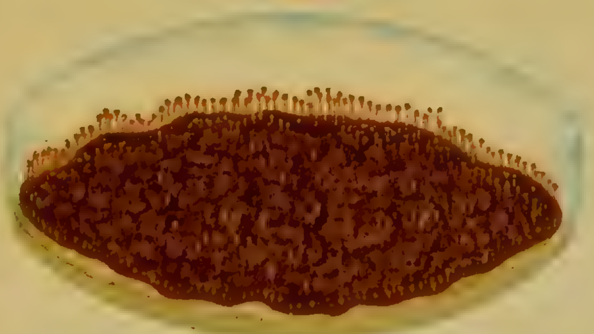



2






3





RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI

VOL. XXXIII. FASC. IV.



*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# I TOSSICI PELLAGROGENI

## in rapporto colle diverse sostanze alimentari e colle stagioni dell' anno

DEL

Dott. CARLO CENI
Direttore dei Laboratori scientifici



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIII. FASC. IV.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# I TOSSICI PELLAGROGENI

## in rapporto colle diverse sostanze alimentari e colle stagioni dell' anno

DEL

Dott. CARLO CENI
Direttore dei Laboratori scientifici



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1907.


LIBRARY

Una delle obbiezioni che più di frequente si fa al concetto tossico-parassitario da me sostenuto nell' etiologia della pellagra, si è che i parassiti specifici si possono riscontrare in molte sostanze alimentari che servirebbero loro di veicolo per entrare nell' organismo (p. es. nelle frutta guaste, nello stracchino di Gorgonzola, ecc.), l' uso delle quali non ha mai presentato dei rapporti speciali con questa malattia.

Nelle mie precedenti pubblicazioni sull' attività tossica dei parassiti pellagrogeni, già più volte feci notare come questa può variare non solo colla natura del mezzo nutritivo su cui i funghi si sviluppano; ma anche colle diverse condizioni in cui uno stesso mezzo nutritivo viene usofruito. Esponendo i miei primi reperti sulle proprietà tossiche dell' *Aspergillus fumigatus* ho insistito p. es. sul fatto, che questo ifomiceta, a parità di condizioni d' ambiente, può crescere sulle cariossidi di *mais*, tossico o atossico a seconda del grado di minore o maggiore idratazione del cereale stesso.

Altrove, col Dott. Besta, trattando del *Penicillium glaucum*, facevo pure osservare come quest' altro ifomiceta non di rado nelle nostre esperienze si fosse presentato meno tossico sul *mais*, che sul liquido Raulin.

Osservazioni molto simili furono fatte anche da altri ricercatori, specie variando la composizione dei substrati artificiali. Paladino Blandini, assistente ai Laboratori del Gosio, dà poi tanta importanza alla natura del mezzo nutritivo, che in una sua recente pubblicazione, improntata forse un po' troppo a un evidente spirito di contraddizione [1], arriva perfino a sostenere che

[1] Nel campo della etiologia della pellagra ecc. Questa *Rivista*. Vol. XXXIII. Fasc. II.-III.

le stesse oscillazioni da me osservate fin qui nell' attività tossica delle muffe pellagrogene nelle diverse stagioni dell' anno non possono, in gran parte almeno, che dipendere da eventuali modificazioni avvenute nel liquido di Raulin, al quale io ho ricorso quale mezzo nutritivo costante. L' aver io adoperato, almeno nelle ultime ricerche sul ciclo biologico dei penicilli in rapporto colle stagioni, lo stesso liquido colturale preparato una volta per tutte all' inizio delle esperienze, constituirebbe secondo questo autore, un così grave errore da compromettere seriamente i risultati delle esperienze. In conseguenza della sua lunga conservazione, questo liquido, per azione della luce e dell' ossigeno atmosferico, andrebbe soggetto, sostiene egli, a lente, ma continue e così marcate modificazioni, da renderlo capricciosamente ora un terreno colturale adatto, ora disadatto per simili ricerche.

In appoggio a queste sue affermazioni cita i nomi autorevoli di Raulin e di Pasteur, che sperimentalmente dimostrarono (cosa che non ha nulla a che fare colla tossicità) la sensibilità squisita in genere delle muffe ai diversi agenti fisici e chimici.

Senza entrare a discutere le ipotesi di questo autore che fino a prova dimostrativa io dovrò giudicare quale parto della sua fervida fantasia, solo a titolo di curiosità faccio qui notare quanto egli discordi in ciò dal suo maestro, Prof. Gosio, il quale all' ultimo Congresso Pellagrologico in Milano trovava invece che un grande coefficiente d' errore delle mie ricerche pubblicate fino allora sullo stesso argomento, doveva consistere nell' aver io adoperato quale mezzo colturale del liquido Raulin preparato volta per volta nei singoli periodi dell' anno. Il Gosio, se la memoria non m' inganna, avvalorava le sue obbiezioni ricordando pure i succitati studi di Raulin e Pasteur, e veniva così ad ammettere come sia presso a che impossibile in pratica preparare, in due tempi diversi, due campioni di liquido Raulin eguali nella loro costituzione chimica....!?

A simili obbiezioni e ad altre più o meno serie che il Paladino nella sopra ricordata pubblicazione muove ai miei lavori sul rapporto tra l' attività tossica delle muffe pellagrogene e le stagioni dell' anno, mi riservo di rispondere più tardi, contrapponendo nuovi dati di ricerche in corso su tale argomento. Però non posso a meno di far rilevare fin d'ora alcune inesattezze nelle citazioni dei miei lavori (escludo la malafede), non che la

superficialità della critica e delle argomentazioni di questo egregio mio contradditore.

Per ciò che concerne l' esagerata importanza ch' egli vuol dare alla diversa natura dei mezzi colturali a spiegazione dei risultati da me ottenuti sulla tossicità delle muffe nelle diverse epoche dell' anno, mi rimetto alle conclusioni delle ricerche che riassumo nella presente nota; convinto che queste vengano a dare un' idea obbiettivamente abbastanza esatta dell' influenza che esercitano i diversi terreni colturali sull' attività tossica di questi funghi, di fronte a quella esercitata su di essi dalle stagioni.

Le variazioni della temperatura che si hanno nelle diverse stagioni, prosegue il sopramenzionato autore, possono aver pure grandemente influito sulle oscillazioni della tossicità da me osservate; ma le stagioni per se stesse, egli afferma nel modo più categorico, non possono avere alcuna importanza in questi fenomeni. « Troppo comodo, egli aggiunge, sarebbe invocare le influenze cosmo-telluriche, vera pietra filosofale dei nuovi alchimisti del secolo XX ecc., per spiegare fenomeni di tanta importanza ».

Anzi tutto confesso che non saprei veramente come scindere il concetto di una stagione dalla sua rispettiva temperatura; per cui più che di « pietra filosofale » sembrami che questo autore dovrebbe pur persuadersi che si tratta quì di una questione di buon senso.

Basterà poi dare uno sguardo alle diverse mie pubblicazioni su questo argomento, per convincersi facilmente ch' io non solo non ho mai inteso e non intendo eliminare l' influenza della temperatura, propria delle diverse stagioni, sui risultati delle mie esperienze, come il mio egregio contradditore con abilità da giocoliere cerca di far credere; ma che io anzi, assai prima di lui, richiamai sul valore di essa l' attenzione. Esponendo i risultati ottenuti coll' *Aspergillus fumigatus*, coltivato a temperature diverse nelle varie epoche dell' anno, già affermavo che la tossicità di questo fungo non poteva ritenersi in esclusivo rapporto colla temperatura necessaria al suo sviluppo; ma bensì con tutto quel complesso di fenomeni naturali (non esclusa la temperatura) che costituiscono le stagioni. In seguito, riferendo i risultati avuti con altre specie di Aspergilli (*ochraceus, varians*, gigante bruno) e coi Penicilli verdi, ben lungi dal disconoscere la parte che ha la temperatura sulle oscillazioni della tossicità

delle muffe nelle varie epoche dell' anno, più volte ho fatto invece rimarcare come tali oscillazioni persistono anche quando nelle stagioni fredde si favorisce lo sviluppo delle muffe coltivandole alla stufa. Alla temperatura ambiente del nostro clima in questi casi le muffe risultarono poi evidentemente sempre ancor meno tossiche che alla temperatura della stufa. Ho però fatto notare a tale proposito come da noi nell' inverno la massima parte delle muffe da me studiate a temperatura ambiente o non crescevano affatto o crescevano assai male, senza sporificare ecc. È questa anzi la ragione principale, dissi fin d' allora, per cui nelle stagioni fredde ricorsi anche alla temperatura riconosciuta quale *optimum* per lo sviluppo delle varie muffe. Ma di tutto ciò il Paladino non ritiene opportuno tener conto e riporta oggi, dopo qualche anno dalle mie, le sue esperienze fatte a temperature diverse, quale una geniale trovata e irrefragabile dimostrazione contro un possibile rapporto fra tossicità e stagioni.

Protestando ironicamente contro le credenze nell' influenza delle stagioni sui fenomeni naturali in genere, riporta egli i risultati delle sue ricerche coll' audace presuzinone di aver scoperto che tutto si riduce ad effetto di temperatura.

Il Paladino, difende la sua tesi sostenendo che perfino i risultati di alcune mie esperienze parlano contro un' influenza delle stagioni. Egli si riferisce qui a quei pochi campioni di muffe che, da me coltivate alla stufa, diedero tossici anche nell'inverno, come credo voglia riferirsi ad altri che diedero pure dei tossici egualmente nell' estate, nella primavera e nell' autunno. A questa obbiezione non mi resta di rispondere che ripetendo quanto già in altra occasione ebbi a dire a questo autore (vedi mia nota su di un Aspergillo gigante bruno, in questa *Rivista*, 1906); cioè, che le mie conclusioni sono tratte dal complesso dei numerosi risultati avuti sperimentando su parecchie specie e varietà di muffe; ma non già desunte da esperienze eseguite su di una singola specie o varietà; come appunto fin qui si era fatto da chi si occupava di pellagra.

Del resto le eccezioni a cui accenna il Paladino, più che in danno, credo che vengano in vantaggio della mia tesi; giacchè esse dopo tutto non sono così in dissonanza aperta, com' egli vuol lasciar intravedere, col decorso della stessa endemia pellagrosa. Se questa, infatti, presenta, come è risaputo, le fasi di massima recrudescenza in primavera e in autunno, ciò non

vuol dire che manchino casi di pellagra anche in altre stagioni. Io vidi nel nostro Istituto, nel periodo di circa 10 anni, perfino dei casi di pellagra acuta non solo nell' estate, ma anche nell' inverno e sopratutto nel febbraio di alcuni anni in cui la buona stagione favoriva anche un germogliare precoce della natura.

Un caso tipico di tifo pellagroso invernale fu descritto anche dal Belmondo, verificatosi pure nel nostro Istituto nel febbraio 1889 [1]; mentre anche dalle preziose osservazioni di questo autore risulta evidente che questa forma grave è quasi esclusiva della primavera avanzata.

Ho voluto citare l' esempio di eccezioni alla regola nel decorso clinico di questa forma speciale di pellagra, pel valore non indifferente che vengono ad acquistare nella questione della genesi di questa malattia; non potendo in questi casi esistere dubbio alcuno sul rapporto diretto tra i sintomi morbosi e la causa della malattia stessa.

Infine vorrei poi che il mio egregio contradditore nella citazione di quei casi di muffe da me studiate nelle varie stagioni e che sarebbero, seconda lui, in così aperta contraddizione colle mie conclusioni, fosse un po' più esatto.

Per esempio, citando i risultati da me ottenuti coll' Aspergillo bruno gigante sopra ricordato, il Paladino afferma che questo ifomiceta avrebbe dato dei tossici tetanizzanti tanto nel mese autunnale di novembre, quanto in quello invernale di febbraio. Ebbene, basterà vedere la conclusione 3ª di quella mia monografia, nella quale insisto invece nell'affermare che questo fungo in tutto il periodo d'esperimento mi diede solo tossici d'azione deprimente e paralizzante e non mai tossici di natura tetanizzante, per farsi un concetto della serietà con cui il sullodato autore conduce la sua polemica.

Un nuovo coefficiente, e forse questo il più grave, che avrebbe contribuito alle oscillazioni della tossicità da me osservata nelle diverse stagioni, consisterebbe, sempre secondo il Paladino Blandini, nell' aver io ricorso in queste esperienze a colture vecchie approntate due volte l' anno.

[1] Le alterazioni anatomiche del midollo spinale nella pellagra e loro rapporto coi fatti clinici. *Rivista Sperim. di Fren.* Vol. XV-XVI. 1889-90.

Sarei in tal modo incorso nel grave errore della nota legge sui micro-esseri, che nei ripetuti innesti finiscono per perdere i loro caratteri primitivi. Cita per ciò l' esempio classico di Schiottelius che con innesti di prodigioso fatto da culture troppo vecchie arrivò ad ottenere delle varietà prive della caratteristica proprietà cromogena.

A tale proposito ricorderò soltanto che le mie colture erano tutte a un dipresso della stessa età; mentre i risultati avuti nelle varie epoche, furono quasi sempre diversi ed opposti. Se la legge invocata dal Paladino potesse avere un valore negativo nelle mie esperienze, mi domando io come egli potrebbe allora spiegare il fenomeno avveratosi le mille volte, di innesti, fatti anche sempre dalla medesima coltura, i quali rimasero atossici per più mesi nei primi assaggi; mentre divennero poi tossici negli assaggi successivi, quando, cioè, la cultura madre era assai più invecchiata.

Siamo qui davanti a un fenomeno che è in perfetta contraddizione con una legge elementare sui micro-esseri; ma che pure è un fatto e come tale noi dobbiamo rispettarlo.

Nella foga della sua polemica, il Paladino dimentica poi affatto le mie esperienze sull' *Aspergillus fumigatus*, eseguite, com' egli vorrebbe, con seminagioni fatte da colture recenti, da campioni del fungo che isolavo man mano nelle diverse stagioni, all' epoca, cioè, delle singole esperienze. Eppure anche con questo metodo i risultati mi condussero alle stesse conclusioni, ad ammettere, cioè, un' influenza delle stagioni sull' attività tossica delle muffe pellagrogene.

Il Paladino si arrabatta infine a difendere il suo erroneo concetto sull' enorme diversità individuale nel modo di reagire dei tossici pellagrogeni da lui già altrove sostenuto e ch' egli quì pure nuovamente invoca quale coefficiente d' errore delle mie esperienze sui rapporti tra tossicità e stagioni. Egli si basa sempre sui risultati della ormai sua celebre esperienza, eseguita mettendo a contatto della corteccia cerebrale di un piccione, il siero di sangue di un cane rimasto indifferente alla iniezione di estratti alcoolici di muffe, ma che secondo lui invece dovevano essere certamente tossici...!

Già il Besta, nel mio laboratorio, mediante opportune ricerche di confronto, fatte con iniezioni intracraniche di diversi

sieri e d' acqua distillata, dimostrò ampiamente quanto fallace sia questo metodo di ricerca e fece osservare come gli effetti ottenuti dal Paladino nel piccione non possono affatto attribuirsi alla presenza nel sangue di tossici specifici pellagrogeni. Ora io mi domando solo se la corteccia cerebrale degli uccelli e in modo speciale quella dei piccioni sia realmente dotata di una così squisita sensibilità, da giustificare questo metodo che si vorrebbe ritenere tanto preciso e decisivo in una questione così seria e così complessa. Tra i fisiologi è anzitutto sempre aperta la discussione se il cervello degli uccelli in genere rappresenti in realtà, come nei mammiferi, un organo di moto e di senso (Flourens, Rolando, Munk, Schrader, Luciani, ecc). Otto Kalischer poi, nei suoi magistrali lavori sulla fisiologia e anatomia comparata del cervello, conclude che il piccione pei suoi centri corticali poco differenziati e quasi nulla affatto eccitabili, sia da ritenersi tra i meno evoluti degli uccelli. Io stesso ho ripetuto le esperienze di questo autore sul cervello di piccioni e di polli, e confesso che non avrei mai creduto di trovarmi davanti a un organo quasi ineccitabile alle correnti galvanica e faradica e insensibile affatto ai più forti reagenti chimici (potassa caustica, acido cloridrico, acido fenico ecc).

Il Paladino e il Gosio, che anche recentemente ricorsero alle iniezioni intracraniche nei piccioni, di siero di sangue di pellagrosi, colla pretesa di avere così un dato preciso per la diagnosi precoce della pellagra (memoria presentata al concorso Pezzini-Cavallotti, Padova), vedono quindi che le cose non sono tanto semplici), quanto essi se le immaginano.

Il Paladino già in un suo lavoro precedente si aggrappava a una reazione diversa ed opposta degli animali, anche della stessa specie, ai veleni pellagrogeni, per negare allora l' esistenza dei due tipi d' azione diversa ed opposta da me e dal Besta dimostrati. Ebbene, se egli vuole persuadersi che in realtà è erroneo questo suo concetto sulla reazione individuale degli animali, potrebbe sperimentare a breve distanza sopra un medesimo soggetto i tossici d' azione eccitante e convulsivante e quelli d' azione deprimente e paralizzante, iniettando i secondi, per es. quando già sono apparsi i fenomeni caratteristici prodotti dai primi.

Io ho già ripetuto parecchie volte l' esperienza sui cani, anche con piccole dosi di tossici, e ho sempre constatato che,

invece di un' esagerazione dei sintomi determinati dall' iniezione dei primi, come si dovrebbe avere secondo il concetto del Paladino, si ha al contrario, colla seconda iniezione, un quadro d'intossicamento a carattere misto. Se poi la quantità dei tossici inoculati in secondo tempo è superiore alla prima, i fenomeni di coma e di depressione finiscono per prevalere completamente su quelli a carattere d'eccitamento, sui tremori e anche sulle convulsioni.

Con ciò credo di aver risposto alle principali obbiezioni mosse dal Paladino alle mie ricerche sulla tossicità delle muffe pellagrogene in rapporto alle varie stagioni dell' anno. A suo tempo mi riservo, come già dissi, di ritornare sull' argomento coll' aiuto di nuovi reperti di ricerche in corso.

Questo autore accenna infine anche ai risultati negativi ottenuti dagli sperimentatori con muffe pellagrogene cresciute in località non pellagrogene, come p. es. quelli dell' Otto di Freiburg e dello Sturli di Vienna e ch'io credetti di poter mettere in rapporto colle condizioni dell'ambiente. Anche questi risultati, naturalmente secondo lui, non sarebbero invece dovuti che a cause d' errore di quella tecnica, della quale egli sembrerebbe l'unico legittimo possessore. In appoggio al suo preconcetto riporta alcune confidenziali comunicazioni orali fatte di recente al Gosio dallo Sturli, le quali distruggerebbero ogni valore dei primi risultati da questo autore già pubblicati e ottenuti con muffe provenienti dal mio laboratorio e da quello del Gosio stesso.

Non credo il caso di discutere del metodo audace a cui ricorre il Paladino per confutare fatti di tanta importanza. Attenderò invece, per riprendere quest' ultima questione, che i reperti dello Sturli vengano resi di pubblica conoscenza e in tutti i loro particolari.

Mi permetto qui a ogni modo di dire che l' egregio collega di Vienna ebbe pure la cortesia di comunicare oralmente anche a me i suoi più recenti risultati; ma che non mi sembra finora affatto di vedere in essi alcuna contraddizione stridente nè coi suoi primi, ne tanto meno coi miei come sosterebbe il Paladino.

Dopo questa digressione, della quale chiedo venia all'indulgente lettore, eccomi all' oggetto principale dell' attuale pubblicazione, che ha per scopo di mettere in rilievo l' influenza della natura diversa del mezzo nutritivo sull' attività tossica delle muffe pellagrogene, di fronte specialmente a quella che esercitano sulla medesima attività le stagioni dell' anno.

Queste mie ricerche si dividono in due gruppi: quelle del primo sono rivolte a stabilire il potere tossico dei parassiti cresciuti in natura su alcune delle sostanze alimentari su cui si riscontrano più di frequente; quelle del secondo sono rivolte a stabilire il potere tossico di parassiti fatti sviluppare artificialmente su diverse sostanze alimentari previamente sterilizzate.

Al primo gruppo di esperienze appartengono alcuni assaggi fatti del potere tossico del *Penicillium glaucum* sviluppatosi in natura su limoni e su mele, non che sullo stracchino di Gorgonzola. I risultati di questi assaggi naturalmente, per quanto nelle condizioni più favorevoli per uno studio pratico della questione, non potrebbero però avere che un valore limitato, non essendo qui possibile escludere cause d' errori dovute alla presenza di altri parassiti che sulle sopra dette sostanze si sviluppano in natura contemporaneamente ai germi che sono oggetto speciale delle mie ricerche. É solo infatti perchè tali risultati presentano, come vedremo, una notevole concordanza fra di loro nelle varie epoche in cui furono ripetute le esperienze, ch' io credo opportuno di renderli qui di pubblica conoscenza.

Le ricerche sulle frutta le ho fatte su notevole quantità di materiale che raccoglievo nei depositi alimentari del nostro Istituto, scegliendo di solito quei limoni e quelle mele che trovavo più guaste o ricoperte in tutto e in parte da muffe identificate al microscopio per *Penicillium glaucum*. Queste frutta, (nel numero di circa 30-40 per volta) venivano immerse in un litro d' alcool ordinario e lavate mediante uno spazzolino; in modo da asportarne più che era possibile la muffa che le ricopriva. Dall' alcool di lavaggio, che di solito si riduceva a una poltiglia verde scura, facevo l' estrazione dei tossici.

L' esperienza sulle mele fu ripetuta per cinque volte e precisamente nei mesi di Ottobre, Novembre e Dicembre 1906 e nei mesi di Marzo e Aprile 1907. Nelle prime quattro esperienze gli estratti alcoolici iniettati abbondantemente in animali (cani e cavie) non diedero luogo ad alcun sintoma d' intossicamento. Nell' ultima esperienza, in quella dell' Aprile, gli estratti diedero luogo tanto nelle cavie, quanto nei cani a lievi fenomeni di depressione che durarono poche ore e nulla di più.

Le esperienze sui limoni diedero quasi sempre risultati completamente negativi per cinque volte, e precisamente nelle esperienze fatte con materiale raccolto durante l' inverno e sul principio della primavera. Nelle due esperienze invece, eseguite nell' estate e nell'autunno, gli estratti alcoolici inoculati a cavie e a cani, diedero luogo, specialmente nell' autunno, a dei fenomeni d' intossicamento grave e a caratteri convulsivi.

Dai risultati di queste esperienze, quindi, risulterebbe già che la mela rappresenta un *substratum* poco favorevole al *Penicillium glaucum* per la produzione di tossici; mentre il limone rappresenta un terreno più adatto. Sono esperienze naturalmente grossolane, ma che acquistano valore, come vedremo più avanti, perchè i loro risultati concordano con quelli di altre analoghe e compiute con più rigore di tecnica. Non è dei singoli risultati, ma del complesso di essi che noi dovremo tener conto anche in questo caso.

### Esperienze sullo stracchino di Gorgonzola.

Avendo dovuto rinunciare per le difficoltà di tecnica alla estrazione di tossici specifici dello stracchino di Gorgonzola invaso da *Penicillium glaucum*, mi sono limitato a studiarne il potere tossico sottoponendo degli animali alla nutrizione dello stracchino stesso.

Due cani del peso rispettivo di 8500 e di 12040 gr. vennero, nello scorso inverno, sottoposti all' alimentazione esclusiva di stracchino di Gorgonzola vecchio (di oltre un anno di stagionatura) e che risultava diffusamente invaso da *Penicillium glaucum*. Lo stracchino era somministrato ai cani a volontà; cosicchè gli animali nei primi giorni ne mangiarono in abbondanza, da 350 a 450 gr. In seguito però la quantità giornaliera di stracchino consumato andò man mano diminuendo; fino a che negli ultimi giorni gli animali si rifiutarono affatto di mangiarne.

Di questi cani, il primo morì al 9° e il secondo al 13° giorno di alimentazione, con una rispettiva diminuzione di peso di 2040 e di 3700 gr.

Gli animali durante l' esperimento non presentarono mai fenomeni di eccitamento neuro-muscolare, ma bensì scariche diarroiche e fenomeni di depressione progressiva, molto analoghi a quelli che si osservano in seguito all' iniezione di tossici pellagrogeni

d' azione deprimente e paralizzante. Gli animali in questo periodo bevettero molto acqua e morirono in un vero stato comatoso.

All' autopsia non si riscontrò che congestione del tubo gastro-enterico, la quale era assai intensa alla mucosa gastrica e un po' meno a quella intestinale.

Contemporaneamente furono sottoposti altri due cani del peso di 7000 e 7500 gr. alla nutrizione esclusiva di stracchino preparato di fresco, e precisamente dello stracchino che passa sotto il nome di crescienza e che si prepara specialmente in Lombardia durante l' inverno.

Anche in questo caso lo stracchino era somministrato a volontà agli animali, che ne consumarono da 300 a 400 gr. circa al giorno in quasi tutto il periodo di esperimento. Nei primi 10 giorni i cani si mantennero in ottime condizioni generali; ma dopo cominciarono a deperire e a diminuire di peso. Il deperimento diventò progressivo, per quanto assai lento; così che gli animali entrarono presto in uno stato di accentuata cachessia, ma senza presentare fenomeni d'intossicamento specifico. Uno dei cani morì dopo 51 e l' altro dopo 63 giorni, con una perdita rispettiva di 3700 e di 5060 gr. in peso.

All'autopsia non si riscontrò che uno stato di anemia generale profonda, assai accentuata al tubo gastro-enterico: reperto questo di carattere opposto a quello avuto nei due primi cani.

I due primi cani, quelli, cioè, nutriti con stracchino di Gorgonzola invaso abbondantemente da *Penicillium glaucum*, morirono quindi coi fenomeni di un intossicamento a carattere depressivo nel periodo di 9-13 giorni, e all'autopsia il reperto (intensa congestione della mucosa gastro-intestinale) corrispose perfettamente a quello che si riscontra in animali morti per ingestione di tossici pellagrogeni. Gli altri due cani, invece, quelli nutriti con stracchino preparato di recente e senza il fungo suddetto, morirono invece in stato marasmatico dopo 51-63 giorni di alimentazione e all' autopsia non presentarono che i caratteri di una prolungata inanizione (anemia generale).

Nel primo caso gli animali sono morti, in poche parole, per azione di un tossico; mentre nel secondo sono morti probabilmente per inanizione.

Lo stracchino di Gorgonzola, caratteristico per la presenza dell' ifomiceta, contiene perciò dei veleni d' azione deprimente

molto analoghi a quelli che posseggono i parassiti pellagrogeni in determinate condizioni a noi non ancora ben conosciute.

ESPERIENZE ESEGUITE CON SOSTANZE ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE INFETTATE.

Le sostanze alimentari scelte per la preparazione di terreni colturali furono: le farine di *mais*, di frumento e di castagne, le patate, le mele e i limoni. La farina di frumento fu usofruita sotto forma di pane, quella di *mais* e di castagne sotto forma di polenta.

Il pane, la polenta, le patate e i limoni vennero distribuiti affettati in grosse *Erlenmeyer* nella quantità di 250 gr. e senza altro sterilizzati all' autoclave. I limoni però, prima della sterilizzazione, furono lievemente spremuti per facilitare lo sviluppo delle muffe. Le mele furono invece usofruite sotto forma di *purée.*

Tre varietà di *Penicillium glaucum* coltivate contemporaneamente sui sopra detti terreni colturali e su liquido Raulin servirono per la determinazione del potere tossico in rapporto con i diversi substrati nutritivi.

Le colture furono fatte sviluppare in ogni epoca dell' anno a temperatura ambiente. Nei mesi freddi però, cioè nei mesi di Dicembre e di Marzo, come si vedrà più avanti, le esperienze furono ripetute anche con colture fatte sviluppare alla temperatura costante di 19-20°. Le colture, tranne quelle tenute a temperatura ambiente nei mesi freddi, crebbero sempre rigogliose su tutti i mezzi colturali. La prima varietà di P. g. presentò sempre un feltro di color verde cupo più o meno intenso; la seconda e la terza varietà presentarono invece un feltro variabile tra il color grigio ferro e il verde terriccio. Assai più lente, meno rigogliose, con feltro sbiadito e poco sporificato crebbero invece queste tre varietà sui vari mezzi colturali alla temperatura ambiente durante i mesi freddi.

La superficie inferiore della patina in qualsiasi epoca dell'anno e su qualsiasi mezzo nutritivo, nella 1ª varietà si mantenne sempre di color bianco cretaceo e nella 2ª si presentò ora di color giallo limone ora giallo arancio; mentre nella 3ª si presentò di un color rosso mattone nei mesi caldi e di un color feccia di vino nei mesi invernali, sia a temperatura ambiente, che a quella della stufa.

Non essendo sempre facile separare il fungo dai diversi mezzi colturali, questa volta l' estrazione alcoolica del tossico fu fatta dalla patina e dal mezzo colturale insieme e per ogni singolo caso l' estratto venne sperimentato in parte su un cane e in parte sopra una cavia.

Dall' Ottobre 1906 a quello 1907 le esperienze furono ripetute 8 volte nell' ordine della I[a] tabella qui annessa, nella quale sono segnate le singole date in cui vennero fatti gli estratti alcoolici e le iniezioni negli animali.

Per brevità poi tralascio qui di descrivere le singole esperienze e senz' altro riassumo nella tabella sopradetta i risultati delle varie iniezioni fatte negli animali coi diversi estratti alcoolici, limitandomi ad indicare colla lettera T i casi in cui l' estratto ebbe un' azione sugli animali evidentemente tossica con fenomeni tetaniformi, e colla lettera D i casi in cui ebbe un' azione evidentemente tossica, ma con fenomeni di depressione.

I risultati designati con queste due lettere majuscole corrispondono a fenomeni d' intossicamento intenso e presso a che eguali nei due animali di prova (cane e cavia), animali che di solito morirono nel periodo variabile da poche ore a 2-3 giorni.

Nei casi in cui uno o entrambi gli animali di prova ebbero a presentare uno stato d' intossicamento non molto grave e transitorio, a seconda dei sintomi che predominarono, tetaniformi o deprimenti, i risultati sono ancora indicati nella tabella I[a] colle rispettive lettere majuscole T e D, ma seguite queste dalla lettera minuscla l.

Nei casi infine in cui le iniezioni nei due animali non diedero luogo ad alcun fenomeno di intossicamento, i risultati sono indicati colla cifra 0.

Le colture venivano trapiantate ogni due mesi e le seminagioni per le singole esperienze erano fatte dai trapianti più recenti.

TABELLA I. — Risultati complessivi delle iniezioni fatte negli animali (
di *Penicillium glaucum*, coltivate sui dive

| TERRENO COLTURALE | OTTOBRE 2-1906 temperatura ambiente | | | NOVEMBRE 5-1906 temperatura ambiente | | | DICEMBRE 15-1906 temperatura 19° | | | DICEMBRE 27-1906 temperatura ambiente | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* va | | |
| | I. | II. | III. | I. | II. | III. | I. | II. | III. | I. | II. | I |
| 1. Liquido Raulin . . | D. | T. | T. | O. | O. | T. | D. | O. | D.l. | O. | O. | [illegible] |
| 2. Pane frumento. . . | D. | D. | T. | D.l. | D.l. | D. | O. | D.l. | D. | O. | O. | [illegible] |
| 3. Polenta *mais* . . . | O. | D. | D.l. | O. | D. | O. | O. | D. | O. | O. | D.l. | [illegible] |
| 4. Polenta castagne . . | D. | D. | T.l. | D. | O. | T.l. | O. | O. | O. | O. | O. | [illegible] |
| 5. Patate . . . . . | D. | T.l. | D.l. | D.l. | D. | O. | O. | D. | O. | O. | O. | [illegible] |
| 6. Mele . . . . . . | D.l. | D. | D. | O. | O. | O. | O. | O. | O. | O. | O. | [illegible] |
| 7. Limoni . . . . . | T. | T. | T. | O. | T. | T. | D.l. | D.l. | D. | O. | O. | [illegible] |

…tti alcoolici ottenuti nelle singole esperienze eseguite con 3 varietà
…ni nutritivi nelle diverse epoche dell' anno.

| MARZO …2-1907 …peratura 19° | | MARZO 17-1907 temperatura ambiente | | | MAGGIO 1-1907 temperatura ambiente | | | GIUGNO 21-1907 temperatura ambiente | | | AGOSTO 3-1907 temperatura ambiente | | | OTTOBRE 7-1907 temperatura ambiente | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| …*gl.* var. | | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* var. | | | *P. gl.* var | | | *P. gl.* var. | | |
| II. | III. | I. | II. | III. | I. | II. | III | I. | II | III. | I. | II. | III. | I | II. | III. |
| D. | D.l | O. | D. | O. | O. | O. | D.l. | D.l. | D l. | T. | O. | T. | O. | T. | T. | O. |
| O. | D. | D.l. | O. | D.l. | O. | T. | O. | D. | D l. | T. | O. | T.l. | O. | T.l. | T.l. | O. |
| T.l. | D.l. | O. | O. | O. | O. | T. | O. | O. | T.l. | O. | O. | T. | T.l. | T. | T.l. | O. |
| T. | O. | D.l. | T. | O. | O. | T. | O | D.l. | D.l. | D. | T.l. | T. | D.l. | T. | T. | D.l. |
| T. | O. | O. | O. | O. | O. | T. | O. | O. | D.l. | D. | O. | T. | O. | T. | T. | O. |
| O. | O. | O. | O. | O. | O. | O. | D.l. | O. | O. | O. | O. | O. | O. | D. | T.l. | D.l. |
| T.l. | D.l. | O. | T.l. | O. | O. | T. | D.l. | D.l. | T. | D.l. | O. | O. | O. | D. | D.l. | D.l. |

Ecco ora quanto credo che si possa dedurre dai risultati riassunti nella tabella 1ª sulla tossicità del *Penicillium glaucum* in rapporto alle diverse sostanze nutritive e alle stagioni.

L' ifomiceta anzitutto, pur crescendo sempre rigoglioso sulle diverse sostanze alimentari usate (pane di frumento, polenta di *mais* e di castagne, patate, mele e limoni), non sempre ha prodotto dei tossici specifici. Sulle mele, p. es., crebbe quasi sempre atossico; mentre sulle altre sostanze colturali in complesso si presentò più tossico che atossico. Dobbiamo quindi ammettere che tutte le suddette sostanze, tranne le mele, rappresentino degli ottimi terreni colturali, sui quali crescendo il *Penicillium glaucum* può elaborare dei tossici pellagrogeni.

Se però diamo uno sguardo complessivo al numero delle volte in cui questo ifomiceta crebbe tossico oppure atossico sulle singole sostanze alimentari, vediamo come tra queste alcune, specialmente il limone e il pane di frumento, risultino in modo evidente dei terreni colturali più adatti per la produzione di tossici, che le altre (polenta di *mais* e di castagne e patate). Lo stesso liquido Raulin risulterebbe meno adatto del limone e del frumento.

Sopra 30 esperienze eseguite con ciascuno dei suddetti mezzi colturali abbiamo infatti che sul limone l'ifomiceta crebbe atossico solo 9 volte e sul pane di frumento 10 volte; mentre sulle altre sostanze alimentari il numero delle volte in cui il fungo crebbe atossico oscilla da 11 a 22.

Nella tabella II.ª qui annessa, nella quale riporto le percentuali complessive delle volte in cui le tre varietà di *Penicillium glaucum*, cresciute sui singoli terreni colturali, diedero dei tossici d' azione tetanizzante o deprimente, e le percentuali delle volte in cui crebbero perfettamente atossiche durante il periodo di un anno, ci dà un' idea esatta di questa notevole oscillazione del potere tossico in rapporto alla natura del mezzo colturale.

TABELLA II. - Percentuali complessive dei risultati positivi e negativi ottenuti colle singole sostanze alimentari durante il periodo di un anno.

| | Risultati positivi | Risultati negativi |
|---|---|---|
| 1. Liquido Raulin | 56,66 % | 43,33 % |
| 2. Pane di frumento | 66,66 % | 33,34 % |
| 3. Polenta di *mais* | 43,34 % | 56,66 % |
| 4. Polenta di castagne | 63,33 % | 36,67 % |
| 5. Patate | 43,33 % | 56,66 % |
| 6. Mele | 26,66 % | 73,34 % |
| 7. Limoni | 70,00 % | 30,00 % |

Per ciò che può riguardare l' importanza pratica di queste osservazioni, faccio notare solamente come il *mais*, anche usofruito come polenta, risulti tra le sostanze alimentari sperimentate uno dei terreni colturali meno adatto al *P. gl.* per la produzione dei tossici; il che viene una volta ancora a dimostrare quanto erroneo sia il concetto di chi non può ammettere pellagra indipendentemente da questo cereale.

Per quanto riguarda la natura del tossico elaborato dal *Penicillium glaucum*, cioè tossico d' azione tetanizzante (T), o tossico d' azione deprimente (D), merita poi d' esser notato come in genere prevalga il secondo al primo. Inoltre esiste anche un rapporto, se non costante, però abbastanza frequente, tra la natura del tossico e il mezzo nutritivo su cui il fungo si è sviluppato, e a tale proposito faccio osservare come di solito il tossico di azione eccitante e tetanizzante (T) si ottenne di preferenza su quelle sostanze alimentari che in complesso risultarono anche le più adatte per l' elaborazione dei tossici in genere. Così, p. es., sul limone 9 volte le colture ci diedero tossici T e 12 volte tossici D; mentre sulle mele 1 sola volta le colture diedero

tossici T e 7 volte tossici D. Il limone appare ora appunto, come dissi già, tra i mezzi culturali usati il più adatto per la produzione dei tossici: la mela il mezzo meno adatto.

I tossici d' azione D prevalgono quindi quando la natura del terreno colturale è poco adatta per l' elaborazione dei tossici in genere.

Nella III^a tabella riproduco separatamente il numero delle volte in cui l' estratto alcoolico delle diverse colture apparve d' azione tossica T oppure D.

TABELLA III. - Risultati positivi ottenuti colle singole sostanze alimentari durante il periodo d' esperimento e divisi in casi di tossici d' azione tetanizzante (T) e in casi di tossici d' azione deprimente (D).

| | Tossici d' azione T. | Tossici d' azione D. |
|---|---|---|
| 1. Liquido Raulin | 7 | 10 |
| 2. Pane frumento | 6 | 14 |
| 3. Polenta *mais* | 7 | 6 |
| 4. Polenta castagne | 10 | 9 |
| 5. Patate | 6 | 7 |
| 6. Mele | 1 | 7 |
| 7. Limoni | 9 | 12 |

Non tutte le varietà di *Penicillium glaucum* nella produzione dei tossici si comportarono però in modo eguale sui diversi terreni colturali, ma presentarono a tale riguardo diversità così notevoli tra loro, che meritano qui la nostra singolare attenzione. I nostri reperti da questo punto di vista spiegano poi una volta ancora le conclusioni contradittorie a cui giunsero spesso gli autori che pretesero studiare le proprietà tossiche di questa muffa, sperimentando con una sola varietà.

Così, riferendoci ai risultati complessivi esposti nella tabella 1ª, noi vediamo anzi tutto che nelle esperienze eseguite durante il periodo di un anno con ciascuna delle tre varietà di *Penicillium glaucum*, la 1ª di queste dà 30 risultati positivi, e 40 risultati negativi; la 2ª varietà dà 47 risultati positivi e 23 negativi; la 3ª varietà 34 risultati positivi e 26 negativi.

Le oscillazioni nella tossicità degli estratti tra varietà e varietà di *Penicillium glaucum* sono ancor più notevoli se queste vengano considerate in rapporto a un mezzo nutritivo di natura costante.

Infatti riferendoci sempre ai risultati esposti nella tabella 1ª, noi vediamo assai di sovente che p. es. sono positivi quelli di una varietà di *Penicillium glaucum* coltivato su un determinato mezzo nutritivo; mentre son negativi i risultati delle altre due varietà del fungo pur coltivato nella stessa epoca e sul medesimo mezzo nutritivo.

Una perfetta concordanza dei risultati positivi avuti nelle singole esperienze fatte colle tre varietà del fungo, cresciuto anche sul medesimo mezzo colturale, costituisce un fatto molto raro; mentre assai di frequente abbiamo il caso di coincidenze perfette nei risultati negativi; di colture, cioè, cresciute sullo stesso mezzo nutritivo e nella stessa epoca, ma che rimangono innocue per tutte e tre le varietà.

Questa coincidenza dei risultati negativi si osserva prevalentemente nelle esperienze fatte in determinate epoche dell' anno; ma su ciò ritorneremo più avanti, trattando dei rapporti tra tossicità e stagioni.

Qui basti rilevare come le proprietà tossiche anche di una determinata specie di muffa possono notevolmente mutare da campione a campione, da varietà a varietà, pur mantenendosi costanti il mezzo nutritivo e le condizioni d' ambiente (temperatura, ecc.).

Tali variazioni nel potere tossico delle singole varietà del fungo, appaiono ancora più esagerate se si considera la natura del tossico stesso, se, cioè, si raffrontano tra di loro il numero delle volte in cui il tossico delle singole varietà fu d' azione eccitante oppure d' azione deprimente.

La 1.ª varietà sopra 30 risultati positivi ci dà 8 volte tossici T e 22 volte tossici D; la 2.ª varietà sopra 47 risultati positivi,

27 volte ci dà tossici T e 20 volte tossici D; la 3.ª varietà sopra 34 risultati positivi, 10 volte ci dà tossici T e 24 tossici D.

Faccio poi qui notare che i tossici d' azione T predominano in modo singolare nella varietà che diede maggiori risultati positivi, cioè nella varietà 2.ª; mentre i tossici di azione D predominano nelle varietà 1.ª e 3.ª, che apparvero nel complesso dei loro risultati meno tossiche dell' altra.

Anche in questo caso quindi sembrerebbe che la predominanza dei tossici d' azione T sia in rapporto diretto colla potenzialità tossica della muffa; mentre la predominanza dei tossici d' azione D sembrerebbe in rapporto inverso.

Ho voluto quì accennare a questo rapporto tra la natura del tossico e la potenzialità tossica, perchè fu da me già notata anche in altre specie di muffe.

Mi rimane infine a dire delle oscillazioni nella tossicità degli estratti alcoolici nelle varie esperienze esposte nella tabella 1ª e in rapporto colle varie stagioni in cui queste vennero eseguite.

Per brevità riporto senz'altro nella tabella IV. le percentuali dei risultati complessivi positivi e di quelli negativi, ottenuti colle iniezioni degli estratti alcoolici delle colture fatte colle tre varietà di *Penicillium glaucum* nei vari mesi d' esperimento.

TABELLA IV. - Percentuali complessive dei risultati positivi e negativi ottenuti nei singoli mesi colle diverse sostanze alimentari.

| | Risultati positivi | Risultati negativi |
|---|---|---|
| 1. - Ottobre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 95,23 % | 4,77 % |
| 2. - Novembre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 52,38 % | 47,62 % |
| 3. - Dicembre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 14,28 % | 85,72 % |
| temperatura costante 19° | 42,85 % | 57,15 % |

| | Risultati positivi | Risultati negativi |
|---|---|---|
| 4. - Marzo 1907. | | |
| temperatura ambiente | 28,57 % | 71,43 % |
| temperatura costante 19° | 66,66 % | 33,34 % |
| 5. - Maggio 1907. | | |
| temperatura ambiente | 38,09 % | 61,91 % |
| 6. Giugno 1907. | | |
| temperatura ambiente | 76,19 % | 23,81 % |
| 7. - Agosto 1907. | | |
| temperatura ambiente | 38,09 % | 61,91 % |
| 8. Ottobre 1907. | | |
| temperatura ambiente | 80,95 % | 19,05 % |

Da questa tabella risulta evidentemente che nei diversi mesi dell' anno le oscillazioni della tossicità sono notevolissime se si considerano i risultati avuti da culture cresciute alla temperatura ambiente. Esse però persistono, sebbene un po' meno accentuate, se anche si calcolano i risultati avuti durante la stagione invernale con muffe fatte crescere alla stufa.

Il massimo dei risultati positivi corrisponde poi ai due mesi di Ottobre 1906 e 1907 e al Giugno 1907; mentre il minimo corrisponde ai mesi di Dicembre 1906 e Marzo 1907, specialmente se si tien conto dei risultati avuti dalle colture cresciute a temperatura ambiente. Evidentemente però in questi due ultimi mesi, in special modo nel Dicembre, i risultati positivi corrispondono sempre al minimo anche se si vuol tener conto di quelli avuti con colture cresciute a 19-20°.

L' influenza delle stagioni quindi risulta provata anche dai risultati complessivi di queste ricerche eseguite con mezzi colturali tanto diversi ed opposti e con tre varietà di *Penicillium glaucum.*

L' influenza che esercita la natura del mezzo colturale sulla tossicità della muffa passa pertanto in questo caso in

seconda linea; perchè noi osserviamo che nei mesi corrispondenti al massimo complessivo dei risultati positivi, l' ifomiceta è tossico tanto sui mezzi colturali più adatti, quanto su quelli meno adatti per la produzione del tossico. Viceversa nei mesi corrispondenti al minimo dei risultati negativi l' ifomiceta rimane atossico sulla massima parte dei diversi mezzi nutritivi usati, compresi quelli più adatti.

Ripeto, quindi, l' influenza delle stagioni sulla tossicità di queste muffe appare quì superiore di quella che può sulla medesima esercitare la natura diversa ed opposta degli stessi mezzi colturali da me usati.

In termini generali e salvo alcune eccezioni che vedremo più avanti, osserviamo ancora che il maggior numero di casi con tossici d' azione eccitante e tetanizzante corrisponde ai mesi di massima produzione tossica delle muffe; mentre il maggior numero dei casi con tossici d' azione deprimente e paralizzante corrisponde ai mesi di minima produzione tossica. Si confrontino a tale proposito i risultati avuti, p. es., nel mese di Dicembre 1906 con quelli avuti nel mese di Ottobre del 1906 e del 1907. Nei primi mancano affatto casi con tossici d'azione T, se anche si tien conto di quelli avuti con colture cresciute alla stufa; mentre il maggior numero dei casi con tossici d' azione T si ha nei due mesi di Ottobre (1906-07).

Il tossico di tipica azione T corrisponderebbe quindi ancora a stati di attività tossica massima, e quello d' azione D corrisponderebbe invece a stati di attività tossica minima della muffa.

Su questo fenomeno che vediamo ora ripetersi, anche indipendentemente dalla natura del mezzo colturale, mi permetto di richiamare l' attenzione; perchè, secondo me, potrebbe servire a dimostrare l' influenza delle stagioni sul metabolismo delle muffe anche nei suoi più minuti particolari.

Siccome però nei risultati complessivi avuti colle tre varietà nei singoli mesi, questo rapporto tra la natura del tossico elaborato e l' attività tossica dell' ifomiceta, non apparve costante; così, dato qui anche il numero limitato dei campioni di *Penicillium glaucum* su cui si è sperimentato, non mi credo autorizzato di trarre a tale riguardo delle conclusioni.

Rimane a ogni modo dimostrato da queste esperienze come la natura dei tossici elaborati dal *Penicillium glaucum* possa pure variare notevolmente da stagione a stagione, anche indipendentemente dai mezzi colturali.

Nella tabella Vª riporto il numero complessivo dei risultati positivi, divisi in casi con tossici d' azione T e in casi con tossici d' azione D, ottenuti nei vari periodi in cui furono fatte le esperienze.

A spiegazione di questi risultati ottenuti con mezzi colturali di natura così diversa ed opposta, eppure così concordi nelle varie epoche dell' anno, non saprei ora quale altro fattore invocare, al di fuori di un' influenza delle stagioni sulla muffa in esame.

Dico risultati concordi riferendomi sempre al loro complesso e pur sapendo che in mezzo a loro, anche questa volta, esistono dei casi isolati inesplicabili e in apparente contraddizione col concetto nostro sul rapporto tra le stagioni l' attività tossica delle suddette muffe, come sarebbero p. es. i casi negativi verificatisi nei mesi più favorevoli anche con colture fatte sui mezzi nutritivi più addatti per la elaborazione dei tossici (liquido Raulin, pane di frumento).

Io considero però questi ultimi come delle vere eccezioni alla regola generale, dei veri capricci della natura, i quali, conformemente a quanto già dissi in principio di questa memoria, non possono infirmare una legge biologica, che scaturisce da un numero così considerevole di fatti sperimentali e in perfetta armonia col decorso clinico della stessa endemia pellagrosa.

La sola temperatura, infine, la quale, secondo il Paladino, dovrebbe costituire l' unico fattore possibile di oscillazione nella tossicità delle muffe pellagrogene nelle diverse stagioni, anche questa volta non basta a spiegare i nostri risultati. La temperatura ambiente infatti, nei mesi di Ottobre 1906-07 durante le esperienze oscillò tra 18°-20°, e le culture nel Dicembre furono appunto ripetute, come vedemmo più sopra, oltrechè a temperatura ambiente, anche a quella costante di 19°-20°. Con tutto ciò i risultati che si ebbero in queste due epoche furono sempre diversi e opposti.

Le oscillazioni dell' attività tossica del *Penicillium glaucum* in rapporto alle diverse stagioni appaiono poi ancor più evidenti in questo caso se si prendono in esame i risultati avuti colle singole varietà del fungo. Ricorderò a sostegno di ciò come vi furono nelle nostre esperienze delle epoche in cui una determinata varietà rimase perfettamente atossica su tutti i nutritivi; mentre vi furono altre epoche in cui la stessa varietà apparve sempre tossica.

TABELLA V. - Risultati positivi ottenuti nei singoli mesi dell'anno e distinti in casi di tossici d'azione tetanizzante (T) e in casi di tossici d'azione deprimente (D).

| | Tossici d'azione tetanizzante T. | Tossici d'azione deprimente D. |
|---|---|---|
| 1. Ottobre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 8 | 12 |
| 2. Novembre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 4 | 7 |
| 3. Dicembre 1906. | | |
| temperatura ambiente | 0 | 3 |
| temperatura 20° | 0 | 9 |
| 4. Marzo 1907. | | |
| temperatura ambiente | 2 | 4 |
| temperatura 20° | 4 | 9 |
| 5. Maggio 1907. | | |
| temperatura ambiente | 5 | 3 |
| 6. Giugno 1907. | | |
| temperatura ambiente | 4 | 11 |
| 7. Agosto 1907. | | |
| temperatura ambiente | 7 | 1 |
| 8. Ottobre 1907. | | |
| temperatura ambiente | 10 | 6 |

La varietà 1.ª p. es., che crebbe sempre rigogliosa su tutti i terreni culturali usati, rimase tuttavia quasi sempre atossica dal Dicembre 1906 all'Agosto 1907; mentre nel successivo mese di Ottobre apparve dotata delle più tipiche proprietà tossiche su tutti i terreni di cultura.

La varietà 2.ª invece presentò oscillazioni meno accentuate della 1.ª; ma pure sempre abbastanza notevoli. Basta perciò confrontare i frequenti risultati negativi ottenuti nel Dicembre e nel Marzo, specialmente colle colture cresciute alla temperatura ambiente, coi risultati sempre positivi ottenuti invece, p. es., nei due mesi di Ottobre. Simili esempi di diversità individuali li vediamo anche nella varietà 3.ª.

Se anche la temperatura, come già dissi per la natura dei mezzi nutritivi, non basta ora di per sè a spiegare i diversi risultati ottenuti; quale altro coefficiente, ripeto, potremo noi invocare in questi casi se non quello di un' influenza esercitata sull' attività tossica delle muffe da tutto quel complesso di fenomeni che costituiscono le varie stagioni dell' anno?

Solo a dimostrazione contraria, solo quando, cioè, i risultati diversi ed opposti che si ottengono nelle varie epoche dell' anno potranno esser spiegati altrimenti che attribuendo all' ambiente e particolarmente alle stagioni un' influenza diretta sul metabolismo delle muffe, noi potremo prendere in considerazione le ipotetiche obbiezioni mosseci dalla scuola del Gosio e in modo speciale dal Paladino.

Il concetto dell' influenza dell' ambiente sulla tossicità delle muffe deve però essere inteso nei limiti del verosimile e del buon senso; ed è ora entro questi stessi limiti che m' auguro si mantenga la critica dei miei egregi contradditori.

Tenendomi ora strettamente all' obbiettività dei fatti su esposti, ecco pertanto le conclusioni che da essi mi sento autorizzato a trarre.

## CONCLUSIONI

1. Gli estratti alcoolici del *Penicillium glaucum* cresciuto in natura e in diverse epoche dell' anno sulle mele e sui limoni, ora riescono perfettamente innocui agli animali nei quali vengono iniettati anche in quantità considerevoli; ora invece danno luogo a fenomeni d' intossicamento analoghi a quelli che si ottengono dagli estratti fatti da colture pure del suddetto ifomiceta.

2. Lo stracchino di Gorgonzola, dal tipico aspetto marmorizzato per la presenza del *Penicillium glaucum*, se somministrato ai cani quale alimento, determina in questi un quadro d'intossicazione grave e sub-acuta, caratterizzata da fenomeni paralizzanti e depressivi, molto analoghi a quelli che si osservano coi tossici pellagrogeni ch' io già descrissi come d'azione deprimente e paralizzante.

3. Gli estratti alcoolici di colture pure di *Penicillium glaucum*, cresciuto in varie epoche dell' anno e contemporaneamente sopra substrati nutritivi più svariati (pane di frumento, polenta di mais, polenta di castagne, patate, limoni, mele e liquido Raulin) ora presentano un' azione nettamente tossica « sia a caratteri tipici eccitanti e tetanizzanti, sia a caratteri tipici deprimenti e paralizzanti », ora invece risultano perfettamente innocui.

4. L' attività tossica del *Penicillium glaucum* varia notevolmente colla natura del substrato nutritivo. Il limone e il pane di frumento risultano tra i terreni colturali più adatti al *Penicillium glaucum* per la produzione dei tossici specifici. Meno adatti risultano le patate, la polenta di castagne e la polenta di *mais;* meno ancora il *purée* di mele.

5. Non tutte le varietà di *Penicillium glaucum* crescono sui diversi terreni colturali suddetti colla stessa attività tossica; ma possono presentare in proposito delle notevoli variazioni.

I tossici d' azione eccitante e tetanizzante sono elaborati prevalentemente quando l' ifomiceta cresce su quei terreni colturali, sui quali dimostra in genere una maggiore attività tossica (p. es. il limone); mentre i tossici d' azione deprimente e paralizzante sono elaborati prevalentemente su quei terreni colturali, sui quali il fungo dimostra in genere una minore attività tossica (p. es. le mele).

6. L' attività tossica del *Penicillium glaucum* varia ancora in modo più accentuato da stagione a stagione, anche indipendentemente dalla natura dei mezzi colturali.

In determinati periodi dell' anno, specialmente nell' inverno, il *Penicillium glaucum*, al nostro clima, cresciuto anche sulle sostanze nutritive più adatte per l' elaborazione dei tossici (limone, pane di frumento) si presenta prevalentemente atossico; mentre

in altri periodi dell' anno, specialmente nella primavera e nel-autunno, l' ifomiceta cresciuto sui diversi terreni colturali riesce prevalentemente tossico.

I tossici d' azione tetanizzante sono in genere elaborati prevalentemente nelle epoche dell' anno che corrispondono al massimo di tossicità della muffa.

Non in tutte le varietà di *Penicillium glaucum* infine, appare una perfetta coincidenza di tempo nel loro massimo e minimo di attività tossica rispetto alle varie epoche dell' anno; ma esistono a tale proposito variazioni anche notevoli, che non possono essere spiegate che come fenomeni di reazioni individuali alla stessa influenza delle stagioni.

---

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIV. FASC. I.



*Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SULLA PELLAGRA SPERIMENTALE NEI POLLI

## con particolare riguardo alla natura delle sostanze alimentari e alle stagioni dell' anno

PEL

**Dott. CARLO CENI**
Direttore dei Laboratori scientifici



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1908.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIV. FASC. I.

*Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SULLA PELLAGRA SPERIMENTALE NEI POLLI

## con particolare riguardo alla natura delle sostanze alimentari e alle stagioni dell' anno

PEL

**Dott. CARLO CENI**
Direttore dei Laboratori scientifici



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1908.



Espongo brevemente i risultati di nuove esperienze da me eseguite sui polli sottoposti ad una prolungata alimentazione infetta di muffe, meritando essi la nostra più viva attenzione pel contributo che portano ad alcuni problemi oggi maggiormente discussi sull' etiologia tossico-parassitaria della pellagra.

Confermando in gran parte le esperienze del Lombroso, già dimostrai nel 1901-02 [1] come i polli sottoposti ad un'alimentazione di *mais* avariato presentino dei fenomeni acuti e cronici, che per l' analogia con quelli che si osservano nell' uomo pellagroso debbano essere ritenuti caratteristici della pellagra (deperimento, perdita di piume, comparsa di eritema, gravi disturbi intestinali con lesioni specifiche, ecc.), e in seguito ai quali vengono a morire in un periodo variabile da pochi mesi a uno o due anni e anche più.

Nel 1904 feci poi rilevare come questi fenomeni morbosi caratteristici della pellagra nei polli, come nell' uomo, sono ben lungi dal mantenersi costanti nelle varie epoche dell' anno; ma presentano delle notevoli oscillazioni che si susseguono periodicamente e in modo abbastanza regolare nelle diverse stagioni, pur continuando l' alimentazione maidica avariata.

« I polli sottoposti alla nutrizione costante è prolungata di « *mais* avariato, concludevo nell' ultimo lavoro sopracitato, pre- « sentano dei fenomeni tipici della pellagra cronica e acuta, i « quali si esacerbano in modo particolare nella primavera e « meno ancora nell' estate e autunno, e vanno poi scomparendo « nelle stagioni fredde non ostante che l' alimentazione suddetta « rimanga invariata ».

[1] Sul potere riproduttivo e sull' ereditarietà nella pellagra sperimentale. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol. XXVII 1901. Gli Aspergilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra. *Id.* Vol. XXVIII, 1902.

Più volte ho poi richiamato, anche in seguito l' attenzione su questa periodicità dei fenomeni morbosi della pellagra sperimentale nei polli, sia pel valore ch' essa presenta per sè stessa, mantenendosi indipendente dalle apparenti condizioni di avaria del *mais* fornito agli animali; sia per l' analogia e concomitanza dei suoi fenomeni colle fasi di recrudescenza e di remissione che si osservano abitualmente nell' endemia pellagrosa.

Data la grande importanza che questi fatti vengano ad acquistare nella genesi della pellagra, ho voluto ripetere le esperienze con maggior rigore scientifico, sottoponendo ora dei polli ad un' alimentazione infettata artificialmente con una determinata specie di muffa e precisamente col *Penicillium glaucum.*

A tale scopo nel Gennaio 1905 furono allestiti due pollai e in ciascuno di essi vennero installati 4 galline e 1 gallo giovani, dell' età di un anno circa. Un gruppo di polli venne costantemente ed esclusivamente alimentato con *mais* sano e sterilizzato all' autoclave in grandi recipienti di vetro e poi mese per mese infettato con campioni di *Penicillium glaucum,* isolato dall'atmosfera ambiente volta per volta.

L' altro gruppo di polli venne invece alimentato costantemente ed esclusivamente con crusca mescolata a pane di frumento che, previa sterilizzazione all' autoclave, venivano pure infettati, come il *mais,* mese per mese con campioni recenti dello stesso ifomiceta, isolato volta per volta ancora dall' atmosfera ambiente.

L' ifomiceta seminato su questi terreni colturali si lasciò sviluppare a temperatura ambiente dall' Aprile al Novembre; dal Dicembre al Marzo si mise a sviluppare invece a una temperatura costante di 19° circa, non crescendo esso che malamente o nulla affatto in questi mesi a temperatura ambiente.

Il materiale, infine, così preparato, ripeto, mese per mese e sempre abbondantemente ricoperto dalla muffa, veniva somministrato ai polli durante il meso stesso in cui era stato infettato.

L' esperimento fu iniziato il 1° Gennaio 1905 e cessò nel Dicembre 1906. Ecco ora brevemente come si comportarono gli animali in questo periodo di osservazione. Durante il Gennaio e Febbraio 1905 i polli dei due gruppi si mantennero sempre in ottime condizioni generali e nessuna modificazione degna di nota presentarono nè nell' aspetto, nè nel peso. Nel Marzo successivo i polli nutriti con *mais* si mantennero ancora invariati nel loro

aspetto; mentre presentarono una lieve diminuzione del peso, che fu di circa gr. 100 per cadauno. I polli nutriti con pane e crusca di frumento conservarono pure un aspetto normale, ma presentarono una diminuzione di peso più notevole dei primi; diminuzione che oscillò sui 200 gr. in media per cadauno.

Nell'Aprile e più ancora nel Maggio tanto i polli del 1 gruppo, quanto quelli del 2 assunsero invece un aspetto cachetico tutto speciale e caratterizzato particolarmente da uno stato di torpore generale, dalla perdita, spesso assai notevole, delle piume, dalla comparsa di eritemi tipici sulle parti rimaste denudate e infine dalla comparsa di frequenti scariche diarroiche. Il peso loro poi alla fine di Maggio presentò una diminuzione che oscillò dai 450 ai 650 gr. rispetto a quello che era prima dell' esperimento.

Nel Giugno successivo morì il gallo alimentato con pane e crusca di frumento. Esso era quasi completamente spennacchiato, specialmente al collo e al ventre, presentava inoltre abbondante eritema e pesava gr. 820; mentre durante l' inverno il suo peso era di gr. 1790. All' autopsia si notò una spiccata enterite emorragica subacuta.

Tutti gli altri polli sopravvissuti, durante questo mese si mantennero in uno stato pressochè identico a quello del mese precedente; tranne una gallina nutrita con *mais*, la quale aveva peggiorato assai e finì per morire ai primi di Luglio con fenomeni analoghi a quelli del gallo morto il mese prima e sopra ricordato.

Nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre i polli rimasti presentarono un miglioramento abbastanza notevole e progressivo, specialmente nel loro aspetto generale. Il loro peso invece rimase ancora basso, non essendo aumentato in media che di 100 200 gr. da quello che ora nel mese di Maggio.

Questo stato di miglioramento rimase presso che invariato durante l' Ottobre in tutti gli animali, eccettuata una gallina nutrita con crusca e pane di frumento, che invece peggiorò di bel nuovo perdendo ancora 220 gr. del suo peso.

Nel Novembre però anche questa gallina migliorò notevolmente, come pure gli altri polli. Tutti infatti si ricoprirono totalmente di piume e in essi scomparvero gli eritemi e le frequenti scariche diarroiche avute nei mesi precedenti. Alla fine del mese il loro peso presentò un aumento in media di 350-400 gr. in confronto di quello che era stato durante la primavera.

Tale miglioramento fu progressivo; di modo che nel Dicembre il peso di alcuni animali aveva non solo raggiunto, ma sorpassato quello dell' anno precedente, quello, cioè, che era risultato prima che fossero stati sottoposti all' esperimento.

In tali condizioni gli animali si mantennero anche nei mesi di Gennaio e Febbraio 1906.

Nel Marzo successivo e più ancora nell' Aprile gli animali cominciarono di bel nuovo a presentare una progressiva perdita del peso, perdita delle piuma, comparsa della diarrea, ecc., come nella primavera precedente. Questa volta anzi i suddetti fenomeni caratteristici della pellagra sperimentale apparvero più gravi di prima; di modo che tutti i polli già verso la fine di Aprile 1906 avevano perso un terzo e alcuni perfino anche la metà circa del peso che avevano raggiunto durante gli ultimi mesi invernali.

Nel Maggio i fenomeni morbosi gravi rimasero, si può dire, stazionari in tutti i polli; ad eccezione di una gallina che peggiorò ancor di più e morì verso la fine del mese pesando gr. 670. Questa nell' ultimo inverno pesava gr. 1480.

Nel Giugno e più ancora nel Luglio e Agosto successivi gli animali superstiti ripresentarono un nuovo miglioramento generale con un aumento di peso che variò da 50 a 200 grammi per ciascuno.

Nel Settembre il miglioramento rimase pressochè stabile in tutti i polli; fatta eccezione di due galline che invece presentano una nuova ricaduta, segnalata sopratutto da un deperimento assai notevole e dalla ricomparsa di frequenti scariche diarroiche.

Nell' Ottobre e più ancora nel Novembre tutti gli animali, comprese le due ultime galline, migliorarono ancora rapidamente, si ricoprirono di piume e aumentarono progressivamente di peso; così che nel Dicembre successivo si potevano considerare rimessi completamente, ritornati, cioè, nelle condizioni in cui si erano trovati nell' inverno precedente.

In questo mese si sospese l' alimentazione infetta e dal Gennaio 1907 gli animali sopravvissuti vennero trattati con alimentazione sana e mista (*mais* sano, crusca, residui di cucina, ecc.).

I polli dei due gruppi d' esperimento si mantennero sempre in ottime condizioni anche durante la primavera ed estate successiva, senza manifestazione alcuna di quei fenomeni morbosi che avevano presentato durante il 1905 e 1906.

Riassumendo, ora vediamo che tre fatti principali emergono dai risultati delle esperienze qui sopra brevemente esposte; cioè: 1. un' alimentazione infetta di *Penicillium glaucum* e continuata è capace di determinare nei polli i fenomeni caratteristici della pellagra sperimentale, tanto nel caso che questa venga fatta esclusivamente a base di *mais*, quanto nel caso invece che venga esclusivamente fatta a base di frumento; 2. questi fenomeni morbosi presentano imponenti oscillazioni nelle diverse epoche dell'anno; 3. essi possono scomparire completamente se si sospende l' alimentazione infetta.

Per ciò che riguarda la prima proposizione, mi limiterò a far osservare come gli attuali risultati non sieno che una nuova riconferma di quanto io ho sempre sostenuto sui rapporti tra pellagra e la natura della sostanza alimentare; vale a dire: la pellagra si può avere, tanto col *mais* infetto di muffe pellagrogene, quanto con altre sostanze alimentari pure infette delle stesse muffe.

Per ciò che riguarda le notevoli oscillazioni che si osservarono nei fenomeni morbosi dei polli sottoposti ad un regime continuato di un' alimentazione infetta con *Penicillium glaucum*, faccio anzitutto notare come queste si sieno ripetute per due anni di seguito tanto nei polli nutriti con *mais*, quanto in quelli nutriti con frumento. Inoltre trovo assai importante il fatto che queste oscillazioni abbiano costantemente presentato delle fasi di recrudescenza e di remissione in determinate epoche dell'anno analogamente a quanto avevo già osservato nei polli nutriti con *mais* avariato.

Come in quelle esperienze, anche nelle attuali i fenomeni morbosi caratteristici della pellagra sperimentale presentarono infatti il massimo di esacerbazione nella primavera. Nell' estate si notò in essi una lieve, ma apprezzabile remissione, la quale continuò pressochè invariata in alcuni casi anche nell' autunno; mentre in altri casi in quest' ultima stagione riapparve una nuova fase di esacerbazione.

Nell' inverno, a ogni modo, i fenomeni morbosi finirono sempre per scomparire completamente in ambedue i gruppi di polli, non ostante che l' alimentazione infetta non venisse menomamente mutata.

Il ripetersi di questi periodi di esacerbazione e di remissione dei fenomeni morbosi per due anni di seguito e in tutti gli animali nutriti con due diverse sostanze alimentari infette da *Penicillium glaucum*, ci dice quindi chiaramente che la causa di

tutto ciò non può essere nè nella natura della sostanza nutritiva, nè nelle condizioni individuali degli animali d' esperimento. Tale causa non può essere perciò che nelle condizioni dell' ambiente esteriore e precisamente in quel complesso di fenomeni naturali che costituiscono le varie stagioni dell' anno. In poche parole, questi fatti ci dimostrano ancora che le stagioni vengono ad esercitare un'azione diretta sulla causa prima della malattia, cioè, sulle muffe pellagrogene, rappresentate in questo caso dal *Penicillium glaucum*.

L' influenza delle stagioni sull' attività tossica delle muffe pellagrogene non poteva quindi, secondo me, trovare miglior riconferma che nei risultati di queste esperienze; dalle quali, pel modo con cui furono condotte, noi possiamo *a priori* escludere tutte quelle cause d' errore (diversa reazione individuale degli animali ai tossici pellagrogeni, modificazione o perdita dei caratteri specifici delle muffe in seguito a trapianti ripetuti, ecc.) finora invocate dal Gosio e dalla sua scuola per negare l' esistenza di un rapporto tra stagione e tossicità di queste muffe.

Lo stesso Paladino Blandini, assistente del Gosio, che in un recente articolo di polemica arrivò a negare completamente questo rapporto, vorrà ora con me ammettere che qui siamo davanti a dei fatti, per distruggere i quali non basta una critica a base di fantastiche obbiezioni [1]. (Alle principali obbiezioni mossemi da questo autore risposi però altrove [2]).

Mi si rimproverà forse anche nelle attuali esperienze di aver io modificato troppo uno dei caratteri naturali della stagione invernale, mettendo le colture a sviluppare alla temperatura costante di 19 ; invece di lasciarle alla temperatura ambiente, come aveva fatto nelle altre stagioni.

Già dissi più sopra come nell' inverno dovetti ricorrere alla temperatura della stufa per ottenere del materiale infetto in condizioni, almeno nell' apparenza, eguali a quello che ottenevo nelle altre stagioni. Del resto questa modificazione, più che in vantaggio, dovrebbe venire in danno delle conclusioni ch'io traggo dai risultati delle esperienze stesse; giacchè, ripeto, nell' inverno a temperatura ambiente la massima parte delle volte i campioni

[1] Nel Campo dell' etiologia della pellagra ecc. *Rivista sper. di Freniatria.* Vol. XXXIII, 1907.

[2] I tossici pellagrogeni in rapporto colle diverse sostanze alimentari e le stagioni dell' anno. *Riv. sper. di Fren*, 1907.

di *Penicillium glaucum* sul *mais* e sul pane di frumento o non crescono affatto o crescono assai malamente.

Se poi si vorrà considerare che la temperatura a cui ricorsi nell' inverno, oltrechè corrispondere all' *optimum* per lo sviluppo della muffa, corrisponde a un di presso anche alla media della temp. ambiente più comune che si ha in quelle stagioni in cui l' ifomiceta presenta di solito il suo massimo di tossicità, cioè a quella della primavera e dell' autunno; ancor maggiormente risulterà il contrasto dei risultati diversi ed opposti ottenuti nelle diverse stagioni.

Rimane infine a dire della scomparsa dei fenomeni morbosi specifici dei polli sopravissuti a due anni d' esperimento, avvenuta in seguito alla soppressione dell' alimentazione infetta; ma a questa mi accontento d' aver soltanto accennato, quale controprova dell' esperienza stessa e che toglie ogni dubbio sulla causa tossico-parassitaria dei fenomeni morbosi osservati negli animali.

Ritenendo ora superflua ogni ulteriore discussione sui risultati delle esperienze qui sopra brevemente riassunte, ecco le conclusioni ch' io mi credo autorizzate a trarne:

1. Nei polli sottoposti ad un' alimentazione continnata e infettata artificialmente con *Penicillium glaucum* si hanno i tipici fenomeni morbosi della pellagra sperimentale; già descritti dal Lombroso e da me confermati in seguito ad un' alimentazione prolungata di *mais* avariato.

2. La pellagra sperimentale nei polli è però indipendente dalla natura maidica della sostanza alimentare infetta da *Penicillium gl.*; giacchè lo stesso quadro morboso si può avere alimentando gli animali con pane e crusca di frumento, pure infetti dello stesso ifomiceta.

3. I fenomeni morbosi suddetti non sono costanti durante le varie epoche dell' anno, ma presentano delle notevolissime e periodiche oscillazioni da stagione a stagione. Nella primavera si manifestano nel loro massimo grado e meno nell' estate e autunno; mentre nell' inverno finiscono per scomparire completamente, pur mantenendo invariata l' alimentazione infetta.

4. Le oscillazioni periodiche dei fenomeni morbosi non possono infine essere spiegate che con un' influenza speciale che esercitano le stagioni sulla causa diretta della malattia, cioè, sullo stato di tossicità della muffa sviluppatosi sulle sostanze alimentari.

---

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXIV. FASC. I.-II.

# I Veleni delle Muffe Pellagrogene

## E LE STAGIONI DELL' ANNO






Risposta al Dott. Paladino Blandini

DEL

DOTT. CARLO CENI



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1908.



Era già stampato il mio lavoro « Sulla pellagra sperimentale nei polli con particolare riguardo alle sostanze alimentari e alle stagioni dell' anno » che appare in questo fascicolo della *Rivista*, quando il Dott. A. Paladino-Blandini inviava alla Direzione della *Rivista* stessa l'articolo polemico « Le stagioni dell'anno e i veleni delle muffe » che appare pure nel fascicolo attuale; articolo che ha la pretesa di una risposta all' ultima mia pubblicazione « I tossici pellagrogeni in rapporto colle diverse sostanze alimentari ecc. » (Questa *Rivista*, Vol. XXXIII. Fasc. IV) e nel quale egli si sente, a quanto pare, colpito nel vivo.

Il Paladino, però, reagendo con una scarica forse un po' troppo impulsiva, più che di rispondere alle mie obbiezioni, si propone ora nientemeno di distruggere tutto il mio lavoro, di abbattere dalle fondamenta quel tempio babilonesco, che egli dice da me costruito sulla genesi della pellagra, e volendo la rivincita a ogni costo, rabbiosamente cerca e poi crea nuovi errori, nuove contraddizioni in tutto il mio operato dal 1900 in poi, per poter scagliare i suoi strali.

Egli fa ormai del caso una polemica personale e conduce il nuovo attacco cercando sopratutto di fare dello spirito e dell' ironia; ma in questa commedia, pur troppo, riesce così poco brillante, che ottiene l' effetto opposto di quello che si propone.

Ciò sarebbe bastato, come è facile comprendere, ad esonerarmi da una risposta; molto più che il lavoro sopra citato sulla pellagra sperimentale nei polli e che appare in questo numero, si può già per sè stesso considerare quale una irrefragabile smentita delle nuove accuse del Paladino. Se non che nell'articolo polemico in discorso le citazioni e i calcoli, in base ai quali l' autore si propone di dimostrare in modo matematico,

com' egli dice, l' erroneità e la contraddizione dei miei asserti, specialmente in merito alla questione dell'influenza delle stagioni sulla tossicità delle muffe, sono così stranamente inesatti, e spesso così lontani dalla verità, ch' io non posso a meno di ritornare qui sull' argomento, per mettere in luce una volta ancora la serietà e la serenità del polemista.

Sorvolo perciò su tutte le taccie di mistificazione e di incapacità di tecnica di cui ancora mi gratifica il Paladino, a proposito p. es. della dimostrazione da me data (1902) del passaggio delle spore dell' Aspergillo *fumigatus* in circolo quando è introdotto nel tubo gastro-enterico, come del passaggio pure in circolo dei germi comuni abitatori dell' intestino, quando l' aspergillo è introdotto nel cavo peritoneale, ecc.; tutti fatti che, secondo lui, non possono attribuirsi che a grossolani errori di tecnica, a fortuite infezioni delle colture, ai traumi, ecc. Solo mi meraviglio a tale proposito come il Paladino e la scuola a cui appartiene, che da tempo si occupano di queste questioni, abbiano aspettato fino ad ora a far rimarcare questi nuovi fatti che dimostrerebbero quella mia incompetenza in materia che non mancarono di proclamare ogni qualvolta nelle mie pubblicazioni esponevo risultati di esperienze non concordanti colle loro teorie.

Ed eccomi senz'altro alla questione delle stagioni, alla questione principale discussa nell' articolo polemico del Paladino e a dilucidare ogni controversia sulla quale egli abilmente ora ricorre all' ingegnosa trovata di riassumere in un quadro sinottico tutte le mie esperienze sull' argomento, com' egli altamente afferma; per far risultare, colla sua solita audacia e serietà, che anche dal complesso dei miei risultati fin qui ottenuti la teoria dell' influenza delle stagioni da me sostenuta naufraga inesorabilmente.

Vedremo però fra breve come questo riassunto, e ciò mi sarà facile dimostrare, abbia niente meno che la triplice prerogativa di essere **incompleto, illogico** e **non corrispondente al vero.**

Per riportare dei dati precisi in questa sua critica serena, il Paladino si affretta persino ad avvertire (e qui raggiunge il colmo del suo ardire) ch' egli si limita al coscienzioso riassunto degli esperimenti di cui io ho dato una minuta esposizione, e lascia perciò da parte le osservazioni sui 61 penicilli verdi di cui finora ho fatto un' esposizione troppo sintetica e

quelle ancora sull' *Asper. Niger* che non porterebbero ad alcuna conclusione décisiva in proposito di stagioni.

Il Paladino si limita così a riassumere in questo suo ingegnoso ed altrettanto comodo quadro sinottico i risultati di 10 campioni di muffe, cioè, di 7 Penicilli verdi [1] e 3 Aspergilli [2]; ma oltre alle esperienze sui 61 Penicilli e sull'*Asper. Niger*, da lui ricordati, egli lascia nella penna le mie esperienze eseguite su 42 campioni di *Aspergillus fumigatus* [3] e quelle ancora su 17 campioni di Penicilli verdi d'origine germanica [4]; per quanto i risultati di tutte queste furono esposti, com'egli vorrebbe, non in modo riassuntivo, ma in modo minuto, esperienza per esperienza. Salta così, nel suo calcolo coscienzioso, nientemeno che i risultati avuti con altri 59 campioni di muffe, esposti, ripeto, per esteso; e non potrà dire l' egregio polemista di non conoscerli, perchè in parte sono quelli che io stesso gli ricordai nella mia ultima pubblicazione, in quella appunto a cui ora egli reagisce, e in parte furono da lui stesso citati nel suo articolo precedente.

Il Paladino in questo suo ingegnoso riassunto salta poi ancora i risultati delle mie esperienze sulle Isarie e sui Citromiceti [5]; di quest'ultima omissione tuttavia non gli voglio muovere gran rimprovero; perchè le esperienze furono esposte forse in maniera troppo riassuntiva per poter da lui essere prese in considerazione. I fatti che dimostrano a ogni modo come il quadro riassuntivo del Paladino sia grandemente **incompleto,** mi sembrano più che sufficienti.

Ho detto ancora che questo quadro sinottico del Paladino oltre che incompleto è **illogico.** Per dimostrare ciò basterà dire che il polemista parte nei suoi calcoli da criteri così stranamente bizzarri, che gli permettono di segnare, convinto sempre di agire serenamente e seriamente, per casi positivi non pochi di quei risultati che io invece nei lavori originali riporto come

[1] Ciclo biologico dei penicilli verdi. (Questa *Rivista* 1906) e i tossici pellagrogeni ecc. (*idem*, 1907).

[2] Potere pat. dell' *Asper. ochraceus*. (Questa *Rivista* 1905). Di una nuova specie di *Asper. varians* (*idem* 1905). Di un aspergillo bruno gigante (*idem*. 1907).

[3] Le proprietà tossiche dell' *Asper. fumigatus* in rapporto colle stagioni dell' anno ecc. (*Zieglers Beiträger* ecc., 1903. Vedi anche questa *Rivista*, 1904).

[4] Sul potere tossico di alcune muffe germaniche ecc. (*idem*. 1907).

[5] Di alcune nuove muffe ecc. *Atti del III. Congresso pellagrologico di Milano* 1906. Vedi anche: *Atti della Società Italiana di Patologia*, IV. Riunione, 1906.

casi negativi. Ciò gli riesce facile sopratutto non facendo alcuna distinzione nè dell' azione convulsivante o deprimente dei tossici, nè tanto meno degli effetti d' intossicamento gravissimi e mortali, di fronte a quelli assai lievi e affatto transitorii: distinzioni sulle quali io invece ho sempre insistito e insisto tuttora; perchè, a seconda dell' epoca in cui le esperienze vengono fatte, noi vediamo appunto che prevalgono dei tossici di azione e di grado diverso.

Così il Paladino partendo da questo criterio arriva p. es. nel mese di Gennaio a tirare perfino una percentuale di 100 $^0/_0$ di casi positivi, fondandosi sopra i risultati di tre esperienze eseguite con 13 animali e che la massima parte dei quali io invece riporto come casi negativi. Mi sembra logico mettere questi risultati tra i negativi, pel semplice fatto che gli animali in maggioranza, in seguito all' iniezione degli estratti alcoolici, o non diedero luogo ad alcun sintoma d' intossicamento, oppure diedero luogo soltanto a sintomi lievissimi e affatto transitori, durati poche ore; e ciò al contrario di quei casi con fenomeni gravi e mortali che si ottennero in prevalenza in altri mesi, specialmente primaverili.

Lo stesso potrei dire delle percentuali degli altri casi positivi e in modo particolare di quelli dei mesi invernali e che secondo la logica bizzarra del Paladino finirebbero per essere più elevate di quelle dei mesi primaverili e autunnali; mentre in quei mesi invece, secondo me, le muffe risulterebbero dotate della minor attività tossica.

Al mio contradditore occorrevano dei dati matematicamente precisi e perciò bisognava crearli.

Infine ho detto che il quadro riassuntivo **non è conforme al vero,** e di ciò è facile convincersi, quando si pensi che soltanto pei mesi di Gennaio e di Luglio il numero complessivo delle esperienze, riportato dal Paladino e da me eseguite colle 10 muffe sopradette, corrisponde alla verità. Per tutti gli altri 10 mesi dell' anno le cifre riprodotte dal polemista non corrispondono neppure lontanamente alla realtà dei fatti.

Per avere un'idea di tutto questo basterà dare uno sguardo allo specchietto che qui sotto riproduco e nel quale trascrivo, accanto a quello riportato dal mio contradditore, il numero complessivo delle esperienze che io ho eseguite nei vari mesi colle suddette 10 muffe.

Numero delle esperienze eseguite dal Ceni
colle 10 muffe ricordate dal Paladino

| | secondo la verità | secondo i calcoli del Paladino |
|---|---|---|
| Gennaio | 3 | 3 |
| Febbraio | 8 | 7 |
| Marzo | 30 | 5 |
| Aprile | 7 | 6 |
| Maggio | 26 | 9 |
| Giugno | 27 | 9 |
| Luglio | 8 | 8 |
| Agosto | 26 | 9 |
| Settembre | 9 | 8 |
| Ottobre | 34 | 13 |
| Novembre | 30 | 12 |
| Dicembre | 48 | 9 |
| | Totale 256 | Totale 98 |

Dimostrato come la massima parte delle cifre riprodotte dal mio contradditore a indicare il numero delle mie esperienze, son ben lungi dal corrispondere al vero, mi domando io quale valore potranno avere le percentuali ch'egli arriva a trarre dai risultati delle mie esperienze colle 10 muffe ch' ebbero da lui l' onore d' esser prese in considerazione.

Dopo quanto ho qui sopra brevemente esposto, spero che non occorrerà altro per convincere chichessia della serenità e della serietà di discussione del Paladino, il quale ricorrendo puerilmente, come dimostrai, ad un riassunto **incompleto, illogico ed erroneo** dei risultati delle mie esperienze fin qui pubblicate, ha ora l'audace pretesa di aver trovato la via strategica che conduce alla prova matematicamente precisa di una contraddizione tra la realtà dei fatti da me stesso provati e pubblicati e le deduzioni ch' io ne trassi.

Il Paladino poi in questa sua polemica tira in ballo ancora la ormai nota questione del cervello di piccione ch' egli e il Gosio vorrebbero ritenere quale vera bilancia di precisione

negli studi di tossicologia, per la squisita sensibilità di cui quest' organo sarebbe dotato. Ai dati anatomo-fisiologici ch' io gli ricordai nell' ultimo mio lavoro, i quali tutti stanno a dimostrare invece la ineccitabilità quasi assoluta (elettrica, chimica e fisica) della corteccia cerebrale di questo animale, egli contrappone ora il risultato positivo d'una nuova esperienza, eseguita sempre col suo metodo, sopra un altro piccione, coll' iniezione intracranica di una soluzione di acido fenico al 4 $^0/_0$. Dirò solamente che anche i risultati di questa esperienza non sono che una riconferma della fallacità del metcdo; giacchè, ripeto qui ancora, i fenomeni che il Paladino descrive sono sempre quelli che il Besta ottenne anche con iniezioni intracraniche di acqua distillata. Faccio poi osservare che una soluzione di acido fenico al 4 $^0/_0$ è tollerata anche dalla corteccia cerebrale dei vertebrati superiori (perfino dai cani), qualora naturalmente si proceda all' assaggio della sua eccitabilità con metodo fisiologico, escludendo qualsiasi causa d' errore.

Il mio contradditore infine ritorna sulla questione della temperatura che, secondo quanto risultava dall' ultima sua nota polemica, dovea essere la causa unica di tutti quei fenomeni biologici che si osservano in natura e che al tempo della pietra filosofale, com' egli scrive, si attribuivano invece a tutto quel complesso di fatti cosmo-tellurici che costituiscono le stagioni dell' anno. Ora però egli limita la portata della sua scoperta e cercando di dare una nuova interpretazione al valore che voleva attribuire alla temperatura delle stagioni, colla massima ingenuità dice che intendeva solo cominciare a mettere un po' di ordine nella « matassa ceniana » tanto arruffata. Pur ammettendo l' influenza della temperatura, egli ora non intende più di escludere quella di possibili altri fattori nelle oscillazioni che si osservano nella tossicità delle muffe nei vari mesi dell' anno.

Nel nuovo compito che ora così modestamente si propone, il polemista però non manca anche quì di opporre al suo senno e alla sua competenza in tale ordine di ricerche l' ignoranza e l' incompetenza altrui, e giocando d' equivoco e facendo al solito dello spirito di cattiva lega, tenta di porre perfino in dubbio l' onestà e scrupolosità delle mie esperienze.

Nell' ultima mia pubblicazione, che determinò il nuovo attacco impulsivo del Paladino, volendo far rimarcare la diversità dei risultati avuti durante l' autunno e l' inverno, anche

indipendentemente dalla temperatura, accennando alla media della temperatura dei giorni in cui erano state fatte le esperienze autunnali (media pressochè eguale a quella della stufa a cui avevo in parte ricorso per le esperienze invernali) mi sono espresso dicendo « la temperatura del mese di Ottobre oscillò sui 18-19° ». Orbene, il Paladino si attiene allo stretto significato della frase e con un impressionante spirito fanciullesco si sbizzarrisce in un lungo vaniloquio per dimostrare la impossibilità del mio preteso asserto; non sembrandogli vero di poter così profittare del caso per insinuare abilmente una volta ancora il dubbio sulla veridicità delle stesse esperienze.

Dopo tutto ciò credo di aver messo in luce quanto mi premeva in questa nota e mi dispiace di non aver nulla, anche per quet' ultimo argomento della temperatura, da gettare alle ortiche o da rinnegare, come vorrebbe il Paladino; ma getto bensì alle ortiche e rinnego con disprezzo tutto ciò che la fantasia o fors' anco la malafede altrui mi attribuiscono.




---

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXVIII. FASC. IV.



Dott.ri CARLO CENI e CARLO BESTA

# PRINCIPI TOSSICI DEGLI ASPERGILLI "FUMIGATUS" E "FLAVESCENS" E LORO RAPPORTI COLLA PELLAGRA



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: **A. TAMBURINI**
VOL. XXVIII. FASC. IV.

Dott.ri CARLO CENI e CARLO BESTA

# PRINCIPI TOSSICI DEGLI ASPERGILLI "FUMIGATUS" E "FLAVESCENS"

## E LORO RAPPORTI COLLA PELLAGRA



REGGIO NELL' EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1902.



Laboratorio anatomo-patologico dell' Istituto Psichiatrico di Reggio-Emilia

(616 86/969)

Già uno di noi, in un recentissimo lavoro, « Gli aspergilli nell' etiologia e nella patogenesi della pellagra » [1], dimostrava come in questa malattia la morte fosse quasi sempre determinata da una forma speciale di aspergillosi, assolutamente diversa e distinta — tanto dal lato clinico, che da quello anatomo-patologico — dalla pseudotubercolosi aspergillare: poichè, mentre le manifestazioni di questa sono determinate dallo sviluppo del micelio dalla spora nell' interno dei tessuti, nella pellagra si trovano bensì costantemente in certe parti dell'organismo le spore aspergillari, ma queste — incapaci, per speciali condizioni, di proliferare — manifestano la loro attività secernendo dei tossici oltremodo virulenti.

A questa affermazione era arrivato dopo una lunga serie di esperimenti che mostravano la diversità di azione dell' aspergillo, secondochè era introdotto nell' organismo animale in condizione da potersi sviluppare a micelio o no.

Le citate ricerche mettevano in luce completamente nuova le proprietà patogene di una intera classe di germi, la cui azione era considerata da un punto di vista affatto diverso: tutti gli autori infatti che hanno studiato le proprietà patogene degli aspergilli, negano a questi in modo assoluto la proprietà di secernere dei tossici intra od extra-cellulari: il loro potere patogeno sarebbe unicamente legato al fatto meccanico del loro sviluppo nell' interno dei tessuti ed all' enorme assorbimento di ossigeno.

[1] *Riv. Sper. di Freniatria.* Vol. XXVIII. 1902.

Per quanto la prova che sostanze tossiche sono segregate dalla spora si potesse ritenere raggiunta, doveva riuscire interessante — come prova ultima e decisiva — il poter ricavare dalle spore stesse, ottenute in coltura pura fuori dell'organismo, i tossici attivi. A questo scopo abbiamo praticato colle due specie di aspergilli *fumigatus* e *flavescens*, il cui potere patogeno è stato oggetto degli studi citati, una serie di ricerche, di cui diamo ora i primi risultati.

Mentre per l' *aspergillus flavescens*, per quanto a noi consta, nessuno ha eseguito ricerche sulla capacità di produrre dei tossici, per il *fumigatus* esistono invece degli studî. Kotliar [1] ha sperimentato col liquido di coltura filtrato con filtro Chamberland o con semplice carta bibula, ottenendo dei risultati completamente negativi quanto a potere tossico: ebbe, è vero, la morte di alcuni animali, ma per infezione da spore passate attraverso il filtro. Lucet [2] ebbe solo lievi e fugaci aumenti di temperatura: lo stesso ottenne l' Obici [3]. Rénon [4] fece dei tentativi con patine giovani, prive, o quasi, di spore, patine che trattava con soluzione di potassa caustica al 4 $^0/_0$, riprendendo il residuo — previo lavaggio con alcool — con soluzione fisiologica: i risultati furono assolutamente nulli.

Di queste ricerche noi non potevamo tenere conto alcuno, risultando, come si disse, affatto diversa la via da seguire.

Noi dovemmo anzitutto preoccuparci di ottenere delle patine il più possibilmente ricche di spore. Questo, se ci riuscì facile per l' *aspergillus flavescens*, ci presentò notevoli difficoltà per il *fumigatus*. Basti dire che, usando quantità uguali dello stesso liquido di coltura, seminato con quantità uguali di germe in recipienti della stessa grandezza, tenuti nelle medesime condizioni di ambiente, le patine possono essere totalmente diverse tra loro quanto a ricchezza di spore.

Noi abbiamo usato sempre 75 cmc. di liquido di Raulin in scatole Tyndall, seminandoli con 3 cariossidi di *maiz* infettato

[1] Kotliar. Contribution à l'étude de la pseudo-tuberculose aspergillaire. *Annales de l' Institut Pasteur*. 1894.

[2] Lucet. De l'*aspergillus fumigatus* chez les animaux domestiques et dans les oeufs en incubation. Paris 1897.

[3] Obici A. Ueber die pathogenen Eigenschaften des *Aspergillus fumigatus*. *Ziegler's Beiträge*. 1898.

[4] Renon. Essais d'immunisation contre la tuberculose aspergillaire. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie* 1895.

di recente. Le patine, per ambedue i germi, si tennero a temperatura ambiente (Le ricerche vertono sopra patine ottenute nei mesi di Luglio e di Agosto con temperature oscillanti da 25° a 33° centigradi). Abbiamo lasciato a temperatura ambiente anche l' *aspergillus fumigatus*, benchè gli autori indichino come *optimum* per il suo sviluppo una temperatura oscillante tra 38° e 40°, perchè nel liquido usato viene troppo favorita la vegetazione del germe, in modo che le patine riescono formate da un ricchissimo e fittissimo intreccio di miceli e scarse invece di spore.

Operando in queste condizioni di solito si ebbero patine di sviluppo uniforme e ricche di spore al 5°-6° giorno per l' *aspergillus fumigatus*: al 4°-5° per il *flavescens*. Di ambedue le specie abbiamo usato patine di ricchezza diversa di spore, ma sempre di sviluppo recente, avendo Ceni nel lavoro succitato dimostrato come il potere patogeno delle spore aspergillari vada, coll'invecchiare delle colture, rapidamente diminuendo, fino a scomparire quasi del tutto in meno di un anno di tempo.

Per estrarre la sostanza tossica abbiamo tentato varî metodi: diamo ora i risultati ottenuti usando l' alcool a 90° e l' etere.

Con ambedue le sostanze abbiamo usato quantità proporzionali di patina e di liquido: e cioè alla patina accuratamente privata di tutto il liquido di coltura (per l' estrazione con etere veniva seccata quasi del tutto) aggiungevamo il quintuplo in peso di alcool o di etere, che lasciavamo agire per un periodo vario da 4 a 15 giorni: estratto questo liquido ne riaggiungevamo il triplo (sempre in rapporto alla patina) e ve lo lasciavamo per un periodo da 3 a 6 giorni. Trascorso tale tempo, tutto il liquido veniva filtrato ed evaporato completamente (in stufa a 45° l'alcool, a temperatura ambiente l' etere): il residuo secco veniva ripreso con tanti cmc. di acqua distillata quanti erano i grammi di patina impiegati. Le patine in alcool venivano lasciate in stufa a 38° per tutto il tempo: quelle in etere si lasciavano a temperatura ambiente. L' azione sia coll' uno che coll' altro mezzo si è dovuta prolungare per tanto tempo, perchè abbiamo notato che tanto maggiore era la tossicità dell' estratto (almeno per l'*aspergillus fumigatus*) quanto più lungo era il tempo: una digestione durata 24 ore non dà risultati di sorta: l'*optimum* si ha in circa 12 giorni.

Abbiamo usato come solvente solo l'acqua distillata, perchè ci premeva innanzi tutto di stabilire l' eventuale tossicità

dell'estratto: noi diamo ora solo i risultati preliminari: per estrarre totalmente dalle patine la sostanza tossica (poichè, come vedremo poi, alcune esperienze ci hanno dimostrato che nelle patine rimane una parte della sostanza attiva), come pure per isolarla allo stato di purezza, abbiamo in corso delle ricerche.

Il residuo dell' evaporazione, tanto per l'uno come per l'altro germe e con ambedue i metodi, si presenta come un sottile strato di sostanza untuosa, della consistenza e plasticità della cera, di colore giallo sporco, di odore aromatico, con traccie di odor di muffa quello del *fumigatus*, di sapore amarognolo non spiacevole. Si scioglie completamente in piccole quantità di alcool e di etere: coll' acqua invece si divide in due parti, una solubile che coll' acqua forma un liquido limpidissimo, di colore giallo scuro, di reazione spiccatamente acida, l'altra insolubile che forma dei grumi bruni pastosi. La sostanza attiva ci sembra sia tutta contenuta nel liquido limpido: emulsionando in questo, il più finamente possibile, la sostanza insolubile ed iniettandola, non si ha aumento del potere tossico. Ci mancano però esperienze con solventi adatti.

Diamo ora i risultati delle esperienze integralmente desunte dai protocolli. Sono riunite in varî gruppi, secondo il giorno in cui sono state eseguite. Noi abbiamo sempre praticato parallelamente le iniezioni degli estratti, per avere dei termini immediati di confronto sull' eventuale diversità di azione.

Gli animali che ci hanno servito furono quasi sempre conigli e cani, che sono, specialmente questi, assai sensibili al tossico dell' *aspergillus fumigatus:* qualche volta abbiamo usato delle cavie che hanno maggiore resistenza.

Le iniezioni, sempre intraperitoneali, furono naturalmente praticate colle dovute cautele antisettiche: quasi sempre si praticarono le iniezioni in due animali, per evitare errori legati a condizioni individuali.

Gruppo 1.° - *Esperienze del giorno 21 Luglio* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 80 gr. di patina di 6 giorni, formata da un grosso strato di micelio (1 cm. circa di spessore), bianca, quasi assolutamente priva di spore. L' alcool ha agito complessivamente per 8 giorni, il residuo si è ripreso con 80 cmc. di acqua.

Coniglio 1° - Peso gr. 1500 circa. Iniezione di 10 cmc. Nulla di notevole.

(Il giorno dopo si iniettano altri 30 cmc. Nulla di notevole).

Coniglio 2° - Peso gr. 1400 circa. Iniez. di 20 cmc. Nulla di notevole. (Il giorno dopo si iniettano altri 20 cmc. Nulla di notevole).

II. *Aspergillus fumigatus.* - 80 gr. di patina di 5 giorni, formato da uno scarso strato di micelî, ricoperto da un ricchissimo ed uniforme strato di spore, dello spessore di mezzo cmc. circa. L'alcool ha agito per 8 giorni. Il residuo è stato ripreso con 80 cmc. di acqua.

Coniglio 1° - Peso gr. 1500 circa. Iniezione di 10 cmc.

Dispnea intensa quasi subito. Dopo 10 minuti l' animale è agitato da forte tremore diffuso a tutto il corpo con rigidità dei muscoli, nei quali si notano frequenti sussulti bruschi, specialmente forti alla nuca ed agli arti. Il tremore, la rigidità ed i sussulti aumentano rapidamente di intensità: in capo a 15 minuti l' animale cogli arti rigidi e divaricati saltella sul pavimento, incapace di eseguire dei movimenti volontarî. Questo stato dura 5 minuti circa, poi l' animale si rovescia di lato col capo esteso sul dorso in opistotono fortissimo: si ha allora un succedersi rapido di fasi a contrazione tetanica generale, cui segue un breve periodo di rilasciamento generale e poi un accesso epilettiforme con convulsioni clonico-toniche. Durante le fasi di rilasciamento l' animale tenta di eseguire dei movimenti che son tosto interrotti dalle convulsioni: queste sono anche risvegliate da un lieve urto sopra un tendine od un muscolo. I riflessi sono esageratissimi. Le respirazioni, frequentissime durante le fasi di rilasciamento e di convulsione, si rallentano all' iniziarsi dell' accesso tetaniforme: al culmine di questo si sospendono per un periodo variante da 5 a 30 secondi (si ode allora uno stridore laringeo) per riprendere poi frequentissime. Ponendo una mano sul torace si percepiscono, ma non si possono contare i battiti cardiaci.

L' animale ha bava alla bocca: trisma: nelle fasi convulsive i bulbi oculari sono deviati in alto.

Un' ora dopo l' iniezione il coniglio muore in una contrazione tetanica generale, colla colonna vertebrale scricchiolante come se i legamenti si spezzassero.

Autopsia. Iperemia intensa degli organi. Numerose emorragie sottopleuriche.

Coniglio 2° - Peso gr. 2000 circa. Iniezione 15 cmc.

Fenomeni uguali ai precedenti insorti più rapidamente: si nota che il tremore si inizia ai muscoli della bocca e del collo, per estendersi poi rapidamente a tutto il corpo. Dopo 10 minuti si ha completo il quadro descritto precedentemente: l' animale, cioè, presenta frequentissimi accessi tetaniformi con fasi di rilasciamento e fasi convulsive intermedie. Tale stato dura per un' ora e mezza: il coniglio muore, come il precedente, in un accesso tetaniforme.

Autopsia. Iperemia intensa degli organi. Numerose emorragie sottopleuriche.

Coniglio 3° - Peso gr. 2500. Iniezione di 20 cmc.
Fenomeni uguali ai precedenti. Morte in un' ora e mezza.
Autopsia. Iperemia degli organi interni. Emorragie sottopleuriche.

Cavia 1ª - Iniezione di 1 cmc. Nulla di notevole.

Cavia 2ª - Iniezione di 2 cmc. Un po' di impaccio nel camminare per un paio d' ore, poi lieve grado di debolezza per qualche ora.

Cavia 3ª - Iniezione di 5 cmc.
Dopo 10 minuti tremore intenso in tutto il corpo, che è agitato da scosse e sussulti muscolari: poi paresi spastica degli arti, forte specialmente ai posteriori, che sono estesi e rigidi. Volendo camminare l'animale solo con isforzo può usare gli anteriori, ma non essendo il corpo sostenuto dai posteriori, è continuamente rovesciato ora su un fianco ora sull'altro. Dispnea intensa. Poliuria. Scariche prima solide poi liquide. Lo stato paretico-spastico dura per 3 ore circa: poi i fatti si vanno gradatamente attenuando: subentra però uno stato di paresi generale, che cessa solo dopo due giorni.

III. *Aspergillus flavescens.* - 82 gr. di patina di 4 giorni, di colore uniformemente giallo-verde oscuro, ricchissima di spore, con strato di micelo assai sottile. L' alcool ha agito per 8 giorni, il residuo è stato ripreso con 82 cmc. di acqua.

Coniglio 1° - Peso gr. 1500 circa. Iniezione di 10 cmc. Nulla di notevole.
(Il giorno dopo si iniettano altri 30 cmc., nulla di notevole).

Coniglio 2° - Peso gr. 1400 circa. Iniezione di 20 cmc. Nulla di notevole.
(Il giorno dopo si iniettano altri 20 cmc., nulla di notevole).

Gruppo 2° - *Esperienze del 6 Settembre.* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 75 gr. di patina di 6 giorni, uniformemente verde, assai ricca di spore (molto meno però di quella usata nell' esperienza precedente). L' alcool ha agito per 10 giorni, il residuo fu ripreso con 75 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 1500. Iniezione di 10 cmc.
Dopo 10 minuti cominciano tremori e sussulti ai muscoli del muso e del collo, che si estendono rapidamente a tutto il corpo. Insorge il quadro già descritto, cui subentrano tosto gli accessi tetanici, interrotti da fasi di rilasciamento e da fasi convulsive. Gli accessi tetanici però sono di intensità mediocre: dopo un'ora cominciano a diminuire, cessando totalmente dopo tre ore circa. L' animale resta oltremodo debole per un giorno, si rimette però completamente.

II. *Aspergillus fumigatus.* - 60 gr. di patina bianca pressochè senza spore. L' alcool ha agito per 12 giorni, il residuo è ripreso con 60 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 1500. Iniezione di 25 cmc. Nulla di notevole.

III. *Aspergillus flavescens.* - 45 gr. di patina uniformemente giallo-verde scuro, di giorni 6, ricchissima di spore. Trattata con alcool per 16 giorni, si riprende il residuo con 45 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 1500. Iniezione di 25 cmc. Nulla di notevole.

Gruppo 3° - *Esperienze dell' 11 settembre* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 55 gr. di patina di giorni 6, non uniforme: è composta di parecchie chiazze verdi ricchissime di spore, separate da parti bianco-grigiastre in cui le spore mancano quasi del tutto. L'alcool ha agito per 12 giorni, il residuo è ripreso con 55 cmc.

Coniglio 1° di gr. 2500. Iniezione di 10 cmc.

Dopo mezz' ora l' animale presenta dei sussulti muscolari ed un po' di tremore, più intensi al muso ed al collo. Dopo un' ora si riiniettano altri 10 cmc.: le scosse ed il tremore aumentano di intensità: il cammino si fa impacciato per un certo grado di rigidità muscolare. Nessun accesso tetanico o convulsivo. Dopo due ore i fatti descritti sono cessati: resta però una evidente debolezza generale. Poliuria spiccata al cessare dei fatti muscolari.

Coniglio 2° di gr. 1500. Iniezione di 20 cmc.

Quadro analogo al precedente: più intense le scosse muscolari ed i sussulti: più marcato l' impaccio nel cammino per rigidità del treno posteriore. I fenomeni durano 3 ore circa; al cessare si ha poliuria intensa.

II. *Aspergillus fumigatus.* - 55 gr. di patina di giorni 5, uniformemente verde pallido: assai scarsa di spore, che formano un velo sottile sopra uno spesso strato miceliare. Trattamento con alcool per 12 giorni: il residuo è ripreso con 55 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 1500. Iniezione di 15 cmc.

Alcune scosse muscolari al muso ed al collo nella prima ora dopo l' iniezione: dispnea piuttosto forte: poliuria. Pel resto nulla di notevole.

III. *Aspergillus flavescens.* - 30 gr. di patina di 6 giorni, uniformemente giallo-verde scuro; ricchissima di spore. Trattamento con alcool per 20 giorni: il residuo è ripreso con 30 cmc.

Coniglio di gr. 1200 circa. Iniezione di 30 cmc.

Nulla di notevole, tranne un po' di dispnea nella prima mezz' ora dopo l' iniezione.

Gruppo 4° - *Esperienze del 13 settembre* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 90 gr. di patina di giorni 5, ricchissima di spore, formanti uno strato di circa 2 mm. sopra un sottile intreccio di micelo. Trattamento con alcool per 12 giorni. Residuo ripreso con 90 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 2000 circa. Iniezione di 15 cmc.

Otto minuti dopo l' iniezione intensi sussulti muscolari al muso ed al collo: la rima boccale stirata convulsivamente dà al muso un aspetto caratteristico. Rapidamente insorge il quadro generale già descritto. Gli accessi tetaniformi durano intensi per quattro ore, poi diminuiscono gradatamente di intensità, cessando del tutto dopo 8 ore. L' animale resta oltremodo debole e cammina a stento per 24 ore: solo dopo due giorni è completamente rimesso.

II. *Aspergillus fumigatus.* - 100 gr. di patina uniformemente verde, assai ricca di spore che formano uno strato dello spessore di 2 mm. circa sopra un sottile intreccio di miceli. L' alcool ha agito per 12 giorni: il residuo è stato ripreso con 100 cmc. di acqua.

Coniglio di gr. 1500 circa. Iniezione di 15 cmc.

Insorge il solito quadro perfettamente uguale per l' ordine e l'intensità dei sintomi. Dura 9 ore circa, poi si ha debolezza generale forte per 24 ore: poliuria quando cessano i fatti tetanici. Il coniglio si rimette dopo due giorni.

Cagna del peso di Kg. 5,500. Iniezione di 15 cmc.

Due minuti dopo l' iniezione l' animale è inquieto; gira qua e là cogli occhi sbarrati, ansiosi: continua a fregarsi il muso colle zampe, come se volesse scacciare qualche cosa di molesto: fa colla bocca delle strane smorfie: urina abbondantemente ed ha conati di vomito. Poi incomincia tremore agli arti, i quali vanno irrigidendosi e presentano di tratto in tratto dei sussulti bruschi: il cammino resta perciò impacciato: l' animale a volte si accascia sugli arti posteriori, facendo dei premiti forti per urinare, solo dopo lunghi sforzi riesce però ad emettere qualche goccia di urina: d' un tratto, 10 minuti dopo l' iniezione, si getta disteso al suolo e vomita abbondantemente. Poi l' animale si rialza, il cammino si va facendo sempre più difficile per l' aumento progressivo del tremore e della rigidità muscolare, cosicchè ad un certo momento esso si presenta sostenuto dalle quattro zampe rigide, distese ed un po' divaricate: è impotente ad eseguire il minimo movimento, ma è spinto in varia direzione dal tremore muscolare. Dispnea intensissima, trisma. In tale stato rimane per qualche minuto, poi rovescia su di un fianco col capo e il dorso in opistotono. Si manifestano allora accessi tetanici con rigidità muscolare completa (dando una spinta negli

arti posteriori l' animale scivola sul pavimento come un pezzo di legno), rallentamento del respiro fino all' arresto, con stridore glottideo. Gli accessi sono interrotti da periodi di rilasciamento non completo (persistono sempre il tremore ed i sussulti muscolari): non si hanno accessi convulsivi. In questi periodi di sosta la respirazione è frequentissima, oscillando da 140 a 200 respiri al minuto: i battiti cardiaci precipitosissimi non si possono contare. La bocca è piena di bava sanguinolenta per morsicature alla lingua. Di tratto in tratto l' animale fa degli sforzi formidabili per sollevarsi ed allora si voltola sul suolo battendo fortemente e ripetutamente la testa: l' insorgere dell' accesso tetanico interrompe questi tentativi. Durante gli accessi tetaniformi si ha emissione di feci liquide e di urina. I sintomi si aggravano sempre più: l'animale dopo 9 ore circa muore.

Autopsia. Iperemia degli organi interni.

Gruppo 5° - *Esperienze del 22 settembre* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 50 gr. di patina di 5 giorni, ricchissima di spore uniformemente distribuite per lo spessore di 2 mm. circa sopra uno strato di miceli piuttosto spesso. Trattamento con alcool per 12 giorni.

Cane di Kg. 4. Iniezione di 18 cmc.

Dopo due minuti, frequenti sbadigli, scialorrea: dopo 10 minuti vomito intenso. L' animale per un po' sta tranquillo, poi cominciano al collo ed agli arti dei sussulti: gira per la camera cogli occhi sbarrati. Il cammino si fà impacciato per l' insorgere di tremore e di rigidità muscolare: l' animale a tratti si accovaccia e fa sforzi per urinare, ma senza frutto: di quando in quando emette dei guaiti lamentevoli. Talvolta si gratta furiosamente per tutto il corpo. I fenomeni accennati aumentano continuamente di intensità: dopo 20 minuti il cane ha gli arti estesi e rigidi e li muove solo con fatica grandissima: dopo 25 minuti la deambulazione è impossibile e l' animale si rovescia sopra un fianco: dopo mezz' ora insorgono gli accessi tetaniformi, che durano intensi per 4 ore circa. Si ha poi una lenta e progressiva diminuzione dei fenomeni: gli accessi alla 8ª ora sono cessati, invece il tremore e la rigidità muscolare durano molto più a lungo: solo dopo 36 ore si posson dire completamente scomparsi. L' animale resta oltremodo debole per altri 2 giorni, poi gradatamente si rimette. Notevole l' intensa poliuria al cessare degli accessi tetaniformi.

II. *Aspergillus fumigatus.* - 55 gr. di patina di 6 giorni, di colore uniformemente verde-grigiastro, ricchissima di spore, con uno strato di miceli piuttosto spesso. L'alcool ha agito per 12 giorni.

Cane di 6 Kg. Iniezione di 20 cmc.

Quasi subito l' animale entra in grande agitazione: corre per la stanza cogli occhi sbarrati: abbaia di frequente, si ferma impaurito ad

ogni oggetto che incontra sul cammino, guaisce ad ogni movimento delle persone che si trovano nella camera. A tratti si gratta furiosamente. Dopo 15 minuti l' animale si accuccia tranquillamente e pare non abbia più nulla. Dopo 5 minuti però insorgono forti contrazioni delle pareti addominali, che terminano con un vomito abbondante: poi si ha di nuovo un breve periodo di tranquillità; quindi tremori, sussulti, rigidità muscolare, che grado grado aumentano fino agli accessi tetaniformi generalizzati. Il quadro acuto dura complessivamente 5 ore circa, poi si dissipa lentamente. L' animale se ne sta accucciato per 24 ore, rifiutando il cibo. Anche qui al cessare degli accessi tetaniformi si nota poliuria intensa, inoltre numerose scariche diarroiche. Dopo 48 ore il cane si è rimesso.

III. *Aspergillus fumigatus.* - 50 gr. di patina di 5 giorni, ricchissima di spore, con strato di micelî molto spesso. Trattamento in alcool per 14 giorni.

Cane di 5 Kg. circa. Iniezione di 20 cmc.

Vomito abbondante quasi immediato, due scariche poltacee ed abbondante emissione di orina. L'animale ha un po' di scialorrea, fa delle smorfie. Dopo 5 minuti si accovaccia e se ne sta tranquillo per 20 minuti: improvvisamente insorgono tremore e rigidità muscolare molto intense: l'animale si alza e cerca di camminare, il chè gli riesce solo a stento. Dopo 5 minuti si hanno già gli accessi tetaniformi generali, con spasmo glottideo, arresto del respiro, emissione di feci ed urine, ecc. Remissioni rade ed incomplete. Il quadro dura oltre tre ore: si ha poi una remissione graduale assai lenta dei sintomi: il giorno dopo si nota ancora un po' di tremore e di rigidità muscolare. Anche in questo caso poliuria al cessare degli accessi tetaniformi e poi diarrea. L' animale si rimette completamente solo in capo a 3 giorni.

Gruppo 6° - *Esperienze del 24 settembre* - Estratti alcoolici.

I. *Aspergillus fumigatus.* - Soluzione che ha servito per la esperienza II.ª del 22 Settembre.

Cane di 6 Kg. circa. Iniezione di 20 cmc.

Qualche minuto dopo l' iniezione scialorrea abbondantissima e frequenti conati di vomito. Questo insorge fortissimo dopo 25 minuti, la scialorrea persiste. Dopo 5 minuti insorgono sussulti muscolari, tremore, rigidità, che aumentano gradatamente per dar luogo al solito complesso sintomatico. Gli accessi tetaniformi sono però meno intensi, le fasi di relativo riposo più lunghe. Il quadro acuto dura meno di 3 ore: dopo 5 i fatti neuro-muscolari sono ridotti ad alcuni sussulti tendinei. Dopo un giorno il cane è in condizioni normali.

II. *Aspergillus flavescens.* - 90 gr. di patina uniformemente verde-giallo scuro, ricchissima di spore, lasciata in alcool per 20 giorni. Il residuo è ripreso con 45 cmc. di acqua.

Cane di 5 Kg. circa. Iniezione di 30 cmc.

Vomito dieci minuti dopo l'iniezione. Nessun fatto a carico del sistema neuro-muscolare.

Gruppo 7°. - *Esperienze del 29 settembre* - Estratti eterei.

I. *Aspergillus fumigatus.* - 45 gr. di patina uniformemente verde, di giorni 5, ricchissima di spore, trattata con etere per 12 giorni.

Cane di Kg. 6 circa. Iniezione di 15 cmc.

Vomito intenso alcuni minuti dopo l' iniezione, poi forte agitazione motoria. L'animale corre per la camera come spaventato. Dopo 10 minuti insorgono i tremori ed i sussulti muscolari, i quali aumentano progressivamente, ma alquanto lentamente: solo dopo 40 minuti si hanno gli accessi tetaniformi col quadro completo più volte descritto. I fatti acuti durano tre ore e mezza circa: dopo 10 ore cessano i fatti muscolari. L' animale resta debole per 2 giorni. Anche qui si ebbero diarrea e poliuria al cessare degli accessi tetaniformi.

II. *Aspergillus flavescens.* - 55 gr. di patina uniformemente giallo-verde oscuro, di giorni sei, lasciata in etere per 12 giorni. Il residuo è stato ripreso con 30 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 5,500. Iniezione di 30 cmc.

Dopo $^1/_4$ d' ora scialorrea, poi, dopo alcuni conati infruttuosi, vomito abbondante. Dopo mezz' ora insorge uno stato piuttosto spiccato di paresi del treno posteriore, con tremori muscolari insorgenti di tratto in tratto. L' animale se ne stà accucciato. Se lo si stimola si alza e cammina anche in fretta, è però evidente l' impaccio per la rigidità del treno posteriore, inoltre si stanca presto e si accascia. Tali fatti durano un paio di ore circa. L' animale ha dopo un po' di diarrea.

III. *Aspergillus flavescens.* - 70 gr. di patina uniformemente giallo-verde-scuro di giorni 10, ricchissima di spore, lasciata in etere per 12 giorni. Il residuo è stato ripreso con 40 cmc. di acqua.

Cane di Kg. 6. Iniezione di 25 cmc.

Dopo un quarto d'ora l'animale presenta a tratti dei tremori muscolari di mediocre intensità: ha frequenti sbadigli e convellimenti muscolari generali. È un po' paretico e se ne sta accovacciato. Non si nota alcun impaccio nel cammino. Dura in tale stato per un paio d'ore.

Ed ora riassumiamo brevemente i fatti principali che emergono dall'esame delle nostre esperienze.

Spicca innanzi tutto la costanza dei risultati che si ottengono colle patine di *aspergillus fumigatus*: ambedue i metodi di estrazione hanno dato risultati uguali e che analizzeremo poi.

Per l' *aspergillus flavescens* la cosa è ben diversa; l' estratto alcoolico ottenuto, sia in condizioni sperimentali rigorosamente identiche, sia prolungando di molto la durata di azione dell'alcool, ci ha dato costantemente risultati negativi, anche se usato in quantità assai forti.

L' estratto etereo invece ha dimostrato un evidente grado di attività. Essa non è certamente paragonabile neppure agli estratti meno attivi di *aspergillus fumigatus*, il che corrisponde in parte al grado di virulenza minore delle spore del germe stesso, come uno di noi ha già dimostrato; siccome però l'attività dell' estratto è assai minore di quella della spora, noi dobbiamo ammettere che l'etere non rappresenti un mezzo adatto all' estrazione completa del tossico. Quanto si è ottenuto ci permette tuttavia di sperare risultati migliori con altri mezzi, ed è sufficiente a dimostrare (il che risulterà anche meglio per l' *aspergillus fumigatus*) il potere tossigeno della spora.

Per ciò che riguarda la differenza di risultati fra germi così affini per natura e potere patogeno, la causa ci sfugge completamente.

Quanto all' *aspergillus fumigatus* è certamente straordinario e caratteristico il modo di agire della sostanza attiva: dalla descrizione delle esperienze risulta nettissima (a parte le lievi diversità dipendenti dal modo differente di reazione degli animali iniettati) l' uniformità e la costanza del quadro sintomatologico.

La manifestazione principale è l' esaltatissima eccitabilità neuro-muscolare: pochi minuti dopo l' iniezione si ha aumento spiccato dei riflessi, poi, subito, tremori e sussulti, prima limitati ad alcuni gruppi muscolari (collo, muso), quindi diffusi a tutta la muscolatura. Aumentando il tremore insorge un certo grado di rigidità, cosicchè l' animale prova della difficoltà a muovere gli arti ed è impacciato nel cammino. In genere durante questo periodo si ha anche tenesmo vescicale ed anale: nonostante sforzi grandissimi per urinare e defecare, l' animale riesce solo ad emettere piccole quantità di urine e di feci, spesso commiste a sangue.

Il tremore e la rigidità aumentano continuamente, l' andatura assume prima un vero carattere spastico, poi, divenendo impossibili i movimenti, l' animale si presenta sostenuto dagli

arti rigidi e divaricati, agitato da un tremore intensissimo, che lo fa balzellare sul suolo e che lo spinge in varia direzione a capriccio, senza che esso abbia il minimo potere di opporsi. Il capo ed il collo, rigidi, sono leggermente piegati in basso, la mascella inferiore è scossa da uno sbattimento continuo. Dalla bocca cola della bava sanguinolenta. Il respiro è oltremodo accelerato, superficiale, stertoroso, interrotto a tratti da inpirazioni profonde: i battiti cardiaci sono frequentissimi. Tale stato dura poco tempo (2 a 8 minuti), poi l' animale si rovescia sopra un fianco. Cominciano allora gli accessi tetaniformi, varii per intensità e durata, in cui il capo ed il collo in opistotonò, gli arti estesi rendono l' animale rigido come un pezzo di legno. Si ha allora arresto della respirazione, stridore glottideo, deviazione dei bulbi oculari, emissione involontaria di feci liquide e talvolta di orina. Gli accessi sono interrotti da periodi di rilasciamento generale e da convulsioni tonico-cloniche: allora il respiro è frequentissimo (150-200 al minuto), i battiti cardiaci non numerabili.

Questo quadro, o va intensificandosi continuamente, ed allora l' animale muore dopo 4-8 ore nell' acme di un accesso tetaniforme, oppure, dopo aver raggiunto un massimo, i sintomi vanno gradatamente diminuendo di intensità ed allora, dopo un periodo di debolezza generale, l' animale si rimette. In questo caso, al cessare degli accessi tetaniformi si ha sempre una poliuria spiccatissima e diarrea durante un paio di giorni.

Il quadro descritto è il quadro completo: naturalmente esso non è sempre uguale in modo perfetto: nei cani prima che insorgano i tremori si ha di solito un periodo di agitazione motoria, in cui l' animale corre qua e là cogli occhi sbarrati ed emettendo dei gemiti: nei conigli si hanno le convulsioni clonico-toniche, che sono abbozzate nei cani e sono più completi i periodi di rilasciamento generale: nelle cavie si ha solo aumento dei riflessi, tremori, rigidità muscolare; mancano gli accessi tetaniformi.

Così pure, a seconda del diverso grado di attività del tossico impiegato, si può avere un quadro vario: dal semplice aumento dei riflessi con un po' di tremore e di rigidità muscolare (gruppo 1° Esp. I e II) al quadro imponente con morte dell' animale in un accesso tetaniforme (gruppo 1° Esp. II, gruppo 4° Cane dell' Esp. II). Nelle esperienze sono descritte tutte le gradazioni

del quadro sintomatologico, risultando sempre evidentissima l' esaltata eccitabilità neuro-muscolare.

Nessun tossico, per quanto noi sappiamo, ha il potere di produrre un complesso eguale di sintomi: unico riscontro in Patologia si ha negli animali paratiroidectomizzati, in cui però il decorso è più lento ed i fenomeni meno intensi.

È pure uguale il quadro offerto dagli animali a cui si sono inoculate le cariossidi infette od il germe ricco di spore in condizioni da non poter proliferare. La sintomatologia anche in questi casi ha però un carattere meno acuto e meno violento, il che si comprende benissimo essendo, legato ciò alla diversa rapidità di assorbimento ed alla quantità diversa di tossico che in un dato momento entra in circolazione.

Il fatto che i fenomeni prodotti dal tossico estratto dalla spora e quelli della spora stessa introdotta nell' organismo sono uguali, è di una importanza capitale, perchè dimostra in modo inoppugnabile quanto da uno di noi già era stato sostenuto, che cioè la spora dell' *aspergillus fumigatus* (come quella del *flavescens*) è capace di elaborare e di emanare un tossico oltremodo virulento a cui sono dovute le manifestazioni morbose e la morte dell'animale colpito dall' infezione.

E che proprio alla spora sia dovuto il potere tossico lo dimostrano in modo assoluto sia l' innocuità dell' estratto di patina costituita da solo micelio (gruppo 1° Esp. I; gruppo 2° Esp. II, Esp. di Renon), sia il rapporto, che risulta in modo evidente, tra l' attività dell' estratto e la quantità di spore di cui è ricca la patina [Cfr. gruppo 1° Esp. II (la patina più ricca di spore che abbiamo ottenuto) col gruppo 2° Esp. I (patina assai meno ricca di spore) e col gruppo 3° Esp. I e II (patine piuttosto scarse di spore)].

Questo rapporto però non è assoluto: esistono certamente delle condizioni speciali, a noi non ancora completamente note, che aumentano nella spora il potere tossico. È certo che di due patine presentatesi con ricchezza uguale o quasi di spore, ma di cui una ha uno strato sottile di intreccio miceliare, mentre nell' altra l' intreccio è molto spesso, la prima spiega un potere tossico molto maggiore della seconda (Cfr. gruppo 4° Esp. II con gruppo 5° Esp. I-II-III). Si ha qui un modo di azione uguale a quello, già rilevato da uno di noi e di cui ci siamo sempre più convinti dopo una lunga serie di esperienze, che si ha usando

cariossidi di maiz infette con *aspergillus fumigatus*: costantemente cariossidi anche ricchissime di spore, coperte di uniforme vegetazione verde, si dimostrano molto meno attive delle cariossidi su cui si nota solo un tenue velamento verdastro con delle macchioline verdi evidenti specialmente verso l'ilo, costituite però quasi esclusivamente da spore senza o con scarsissimo micelio.

Possiamo perciò affermare in modo certo che esiste un rapporto inverso tra potere tossico e rigoglio di vegetazione.

Sembra anche che l'età della patina abbia un'influenza in questo: le patine non molto recenti sono meno attive, e più specialmente sono scarse di potere quelle in cui, per una causa qualunque, la formazione delle spore è avvenuta più lentamente, in modo da potersi considerare completa solo dopo 20-25 giorni. È certo inoltre che i continui trapianti diminuiscono notevolmente il grado di virulenza del germe: ma sopra questa parte torneremo più tardi.

L'attività della sostanza si mantiene anche sottoponendola a temperature molto elevate: l'estratto molto attivo dell'Esp. I del gruppo 5° manifestò la stessa attività dopo essere stato bollito per 15 minuti: lo stesso fatto si verificò coll'estratto di una patina ricchissima di spore: iniettati due cani di ugual peso con 15 cmc. di tintura, di cui una era stata bollita per 20 minuti, in ambedue si sviluppò il quadro completo più volte descritto.

Il potere tossico si mantiene inalterato se l'alcool filtrato si lascia a sè per lungo tempo prima di evaporarlo; dopo 25 giorni l'estratto alcoolico dell'Esp. II, gruppo 5° era completamente attivo. Invece diminuisce piuttosto rapidamente l'attività della sostanza sciolta in acqua e lasciata a sè a temperatura ambiente: l'estratto dell'Esp. II. gruppo 1°, che è stato il più attivo avendo prodotto (in dose di 10 e 20 cmc.) la morte dei conigli in poche ore, dopo 12 giorni aveva quasi totalmente perduto il suo potere: gli estratti oltremodo tossici delle Esp. dei gruppi 3° e 4°, dopo 8 giorni, iniettati a dei cani in dosi maggiori, produssero solo un moderato esaltamento dell'eccitabilità neuro-muscolare (tremori, sussulti, rigidità) senza accessi tetaniformi: l'estratto dell'Esp. I. gruppo 5°, attivissimo anche dopo la bollitura, dopo 10 giorni ha dato nettissimi, ma molto meno intensi, i fenomeni neuro-muscolari. È notevole il fatto

però che dopo l' iniezione di queste tinture attenuate, gli animali presentarono tutti uno stato di debolezza generale più lungo che colle iniezioni precedenti e diarrea forte durata qualche giorno.

Il perchè di questa attenuazione del tossico solo nella sostanza già disciolta in acqua, per ora ci sfugge: il fatto merita però di essere notato.

Un' altra cosa va segnalata ed è che coi mezzi usati l'estrazione del tossico non è completa: noi abbiamo inoculato a delle cavie piccole porzioni (3-4 cmq.) di patine trattate prima come si è detto, poi lasciate all' aria in ambiente sterile per 24 ore e lavate ripetutamente con acqua distillata: gli animali sono morti in periodi di tempo varii da 36 a 48 ore con manifestazioni neuro-muscolari spiccate. Accenniamo solo di passaggio a tale fatto, che rientra nella questione interessantissima della resistenza delle spore, che sarà trattata a parte.

Per i rapporti tra infezione aspergillare e pellagra i dati da noi riferiti completano e confermano le conclusioni del lavoro citato: è certamente singolare anche qui l' uguaglianza dei sintomi causati dall' iniezione del tossico con quanto si osserva nelle forme acute e subacute della malattia: basta pensare all'esaltata eccitabilità neuro-muscolare, ai tremori, ai sussulti tendinei, alla paresi spastica che, come sono i fatti più importanti nel quadro clinico della pellagra acuta e subacuta, sono anche i più salienti dell' intossicamento da tossici aspergillari. Ci pare inoltre opportuno notare la somiglianza che esiste tra certe forme pellagrose che si manifestano con diarrea e debolezza generale, con quanto si ha per l' iniezione di tossici attenuati.

Le somiglianze accennate sono specialmente evidenti per gli estratti di *aspergillus fumigatus*: riguardo al *flavescens* l' estrazione del tossico ci pare non avvenga in modo completo: pure abbiamo constatato un fatto importante, ed è che l'iniezione del tossico non dà i fatti di eccitamento, che si osservano invece quasi costantemente negli animali iniettati con estratti virulenti di *aspergillus fumigatus;* il che può avere un interesse non indifferente, se si pensa allo stato di eccitamento psicomotorio che si ha nelle forme di pellagra acuta (tifo pellagroso), quali si osservano specialmente in primavera, ed in cui quasi costantemente, come uno di noi ha rilevato nel lavoro su citato, la malattia è determinata da spore di *aspergillus fumigatus.*

Da queste ricerche resta dimostrato ancora una volta che il mezzo nutritivo non ha importanza capitale nell' aumentare o diminuire le proprietà patogene dei germi, le quali sono legate invece a condizioni biologiche speciali degli stessi e più precisamente delle loro spore, e che quindi l'alimentazione maidica non rappresenta, nell' etiologia della pellagra, che il veicolo di trasmissione delle spore dall' ambiente all' organismo.

## Conclusioni.

1. Colla digestione prolungata in alcool ed in etere di patine recenti di *aspergillus fumigatus*, si ottengono delle sostanze dotate di un potere tossico virulentissimo e di carattere specifico.

Sostanze tossiche di attività assai minore e solo coll' etere si ottengono dalle patine recenti di *aspergillus flavescens*.

2. I principi tossici sono legati esclusivamente alle spore dei due suddetti ifomiceti, mentre dai loro micelî non si possono estrarre tossici di alcuna natura.

3. Per l' *aspergillus fumigatus* le proprietà tossiche sono in rapporto in parte colla quantità delle spore, in parte, e più, con speciali caratteri di sporificazione del germe. — In generale si può dire che il potere è tanto minore quanto maggiore è lo sviluppo di micelio e tanto maggiore quanto più netti sono i caratteri di maturità delle spore. — Il mezzo nutritivo su cui il germe si è sviluppato non ha importanza speciale.

4. Il potere tossico dell' estratto di *aspergillus fumigatus* sciolto in acqua e lasciato a sè diminuisce piuttosto rapidamente: esso resiste invece all' ebollizione prolungata ed al soggiorno in alcool.

---



RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: **A. TAMBURINI**
VOL. XXXI. FASC. III.-IV.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SULLA PERSISTENZA
# DEL POTERE VITALE E PATOGENO DELLA SPORA ASPERGILLARE
## NELL' ORGANISMO ANIMALE

CONTRIBUTO SPERIMENTALE ALLA RECIDIVITÀ DELLA PELLAGRA

DEI DOTTORI

CARLO CENI e CARLO BESTA



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1905.

RIVISTA SPERIMENTALE DI FRENIATRIA
Direttore: A. TAMBURINI
VOL. XXXI. FASC. III.-IV.

*Istituto psichiatrico di Reggio-Emilia*

# SULLA PERSISTENZA DEL POTERE VITALE E PATOGENO DELLA SPORA ASPERGILLARE NELL' ORGANISMO ANIMALE

## CONTRIBUTO SPERIMENTALE ALLA RECIDIVITÀ DELLA PELLAGRA

DEI DOTTORI

CARLO CENI e CARLO BESTA

Direttore dei Labor. Scient. del Manic. — Medico Assistente



REGGIO-EMILIA
TIPOGRAFIA DI STEFANO CALDERINI E FIGLIO
1905.


LIBRARY



Le ricerche di Ceni sull' importanza degli aspergilli nell' etiologia della pellagra hanno provato che da svariati organi (meningi, polmoni, pleure, pericardio, ghiandole mesenteriche) di individui morti per pellagra specialmente acuta si possa non di raro isolare in coltura pura l' *Aspergillus fumigatus* che in questi organi si trova allo stato di spora.

Nessun dato si aveva però sulla durata del potere vitale e del potere patogeno di queste spore entrate nell' organismo.

Studiare quanto tempo può la spora aspergillare rimaner viva ed attiva nell' organismo animale è stato perciò lo scopo delle ricerche che noi esponiamo.

Le esperienze sono state eseguite da noi sopra conigli e sopra cani ai quali venivano inoculate entro il cavo peritoneale delle cariossidi maidiche infette con *Aspergillus fumigatus:* sappiamo infatti che in tali condizioni la spora aspergillare è incapace di germogliare, mentre essa manifesta lo stesso in modo netto il suo caratteristico potere tossico (tremori, rigidità muscolare, fatti spasmodici ecc.).

Si inoculava un numero di cariossidi tale che, pur determinando dei fenomeni morbosi evidenti, non provocasse la morte: per provare la vitalità delle spore si uccidevano gli animali a periodi varî di tempo dopo l' inoculazione, le cariossidi raccolte in modo rigorosamente asettico venivano seminate in liquido di Raulin.

Ecco i risultati delle esperienze.

I.° Conigli. — Coniglio 1.° di gr. 2100. Si inoculano due cariossidi. Non presenta fatti neuromuscolari degni di nota speciale, invece va deperendo progressivamente per 20 giorni (disconde a 1200 circa) rimanendo poi stazionario.

Viene ucciso dopo 30 giorni.

Autopsia. Non presenta fatti degni di nota speciale negli organi interni, eccettuata la quasi completa scomparsa del grasso. Le due cariossidi sono inglobate in un blocco di sostanza caseosa grosso come una noce ed aderente alle anse intestinali.

Esame colturale: Al terzo giorno si ha sviluppo rapido e rigoglioso del germe con principio di sporificazione.

Coniglio 2.° di gr. 2070. Si inoculano due cariossidi. Anche questo non presenta fatti neuromuscolari ma deperisce rapidamente, discendendo a gr. 1400 in 15 giorni. Rimane a lungo stazionario e sempre cachettico. Viene ucciso dopo 2 mesi e mezzo.

Autopsia. Gli organi non presentano fatti degni di nota. Le cariossidi sono ravvolte da sostanza caseosa densa e, all'esterno, da uno strato di tessuto connettivo aderente alle anse intestinali.

Esame colturale: Già dopo 48 ore si ha abbondante sviluppo del germe con sporificazione dopo tre giorni.

Coniglio 3° di gr. 2200. Si inoculano due cariossidi. Nessun fatto neuromuscolare, invece deperimento progressivo per 15 giorni, poi stato stazionario per oltre un mese, quindi miglioramento assai lento. Viene ucciso dopo 5 mesi e mezzo, pesando 1750 gr., assai meno quindi del peso primitivo.

Autopsia. Nulla di notevole agli organi interni. Cariossidi circondate da un grosso strato di tessuto connettivo, con sostanza caseosa molto scarsa.

Esame colturale. Dopo 48 ore si ha già sviluppo di micelo. Non si ha sporificazione perchè le cariossidi sono andate al fondo della provetta ed i ciuffi di micelo non arrivano alla superficie del liquido, condizione necessaria per la formazione delle spore.

II.° Cani. — Cane 1.° Si inoculano 5 cariossidi. Dopo alcuni giorni il cane presenta una andatura lievemente spasmodica: gli arti posteriori sono mossi in modo rigido e piegati con una certa difficoltà. Vi è pure un po' di deperimento, ma transitorio. Dopo un mese l'andatura accenna a migliorare: però un certo grado di rigidità persiste ancora dopo due mesi, epoca in cui l' animale viene ucciso.

Autopsia. Gli organi interni non presentano fatti degni di nota. Le cariossidi sono ravvolte in una spessa capsula di tessuto connettivo contenente anche della sostanza caseosa.

Esame colturale. Dopo 48 ore si ha già sviluppo rigoglioso di micelo e dopo due giorni, comparsa delle spore.

Cane 2.° Si inoculano 5 cariossidi. L' animale viene ucciso dopo 95 giorni. (Questo cane che presentò dopo due mesi dei singolari fenomeni atassici è stato oggetto di uno studio speciale pubblicato sopra questa *Rivista*. Rimandiamo per particolari al lavoro accennato).

Autopsia. Non si osservano all' esame macroscopico fatti degni di nota negli organi interni. Cariossidi ravvolte in una sacca di tessuto connettivo contenente del liquido e scarsa sostanza caseosa.

Esame colturale. Dopo 48 ore si ha sviluppo abbondante del germe.

Cane 3.° S' inoculano 5 cariossidi. Si comporta in modo identico al primo cane. Dopo 3 mesi pare in condizioni normali. Viene ucciso dopo 5 mesi e mezzo.

Autopsia. Nessun fatto degno di nota agli organi interni. Cariossidi circondate da scarsa sostanza caseosa racchiuse in una sacca di tessuto connettivo aderente alla parete addominale.

Esame colturale. Dopo 48 ore proliferazione rigogliosa con sporificazione dopo tre giorni.

Cane 4.° Si inoculano 5 cariossidi. Si comporta come il primo ed il terzo cane. Dopo tre mesi però i fatti spasmodici sono, si può dire, cessati, solo si osserva che il cane ha un po' di difficoltà nel salire le scale e che è lievemente impacciato nel correre. Dopo sei mesi pare in condizioni completamente normali. Viene ucciso dopo 10 mesi.

Autopsia. Nessun fatto degno di nota negli organi interni. Le cariossidi sono ravvolte da uno spesso strato di tessuto connettivo, senza sostanza caseosa.

Esame colturale. Al terzo giorno si ha proliferazione abbondante del germe: al quarto si inizia la sporificazione.

Pare a noi che i risultati delle esperienze suesposte siano di un interesse notevolissimo: certo non si sarebbe potuto supporre che la spora aspergillare potesse in condizioni tali mantenere integra la sua vitalità per un tempo così lungo, e dopo che l' organismo dell' animale inoculato aveva dispiegato dei processi difensivi (leucocitosi e capsula connettivale) così forti.

Poichè noi sappiamo (e ciò risulta specialmente da nostre ricerche) che la spora aspergillare viene nell' organismo distrutta

probabilmente per azione dissolvente di sostanze di natura leucocitaria e poichè nei nostri animali si erano dopo un po' di tempo dissipati i fenomeni morbosi, sarebbe stato logico il supporre che le spore introdotte colla cariosside fossero state distrutte.

Il fatto invece che il potere vegetativo è rimasto sempre rigogliosissimo tanto da non mostrare differenza dalle cariossidi normali, dimostra invece che le spore aspergillari hanno resistito completamente e che sono rimaste intatte.

E come spiegare allora la cessazione dei fenomeni morbosi? Si è avuto nei cani nostri l' adattamento dell' animale od ha la spora segregato tutto il tossico di cui era capace rimanendo poi dello stesso stato delle spore invernali che non contengono tossico?

Noi richiamiamo l' attenzione sul risultato dell' esperienza seconda (quella che è stata oggetto di uno studio speciale) in cui il cane ha presentato i segni della sclerosi in placche quando i fenomeni soliti erano pressochè scomparsi. Ciò fa pensare che fosse qui in corso l' adattamento dell' animale ai tossici, e che l' intervento di un fatto accidentale, abbia reso possibile ai tossici aspergillari, sempre circolanti nell' organismo, di produrre le gravi lesioni da noi riscontrate e descritte.

Certo pare impossibile a noi ammettere che il processo di sclerosi in placche sia stato provocato da altri agenti che i tossici aspergillari.

Ad ogni modo a risolvere il problema noi abbiamo eseguito due serie di esperienze: nella prima abbiamo inoculate a delle cavie le cariossidi rimaste per un periodo più o meno lungo di tempo entro il cavo peritoneale dei cani: nella seconda abbiamo sottoposto dei cani inoculati con cariossidi aspergillari ed in cui si era già prodotta la guarigione apparente, a cause che in qualche modo ne diminuissero la resistenza organica.

Ecco i risultati della prima serie.

I.° - Cavia 1ª. - Si inoculano nel cavo peritoneale 2 cariossidi rimaste per un mese nel cavo peritoneale di un cane (nel quale i fenomeni morbosi erano molto attenuati).

Muore in tre giorni ed all' autopsia si riscontra una forte reazione peritoneale.

Cavia 2.ª - Si inoculano 3 cariossidi come le precedenti.

Muore in due giorni presentando un identico reporto.

II.° - Cavia 1.ª - Si inoculano due cariossidi rimaste per due mesi.
Muore in tre giorni e mezzo presentando fenomeni congestivi del cavo peritoneale.

Cavia 2.ª - Si inoculano tre cariossidi come le precedenti.
Muore in due giorni con identico reperto.

I risultati di queste esperienze provano in modo decisivo che la spora aspergillare conserva integre le sue proprietà biologiche, anche dopo un soggiorno lunghissimo entro il cavo peritoneale. Non vi è infatti una grande differenza nella rapidità della morte in confronto delle cariossidi normali: da parte dell'animale inoculato evidentemente ha luogo un graduale adattamento. Di questo si ha una prova di un valore ugualmente decisivo nei risultati della seconda serie di esperienze.

Noi abbiamo anzitutto provata la più semplice e più ovvia causa debilitante e cioè il digiuno.

Due cani vennero inoculati con 4 cariossidi infette di *Aspergillus fumigatus* tetanico; essi presentarono dopo alcuni giorni i soliti fenomeni neuromuscolari (rigidità degli arti - tremori - sussulti) non molto forti data la scarsa quantità di materiale inoculato, che durarono però evidenti per 12-15 giorni diminuendo gradatamente poi fino a cessare.

Un mese e mezzo dopo l'inoculazione ambedue gli animali vennero posti a digiuno assoluto.

Per 5 giorni non si notarono fatti degni di nota speciale, ma al 6.° giorno incominciarono lievi tremori ed un po' di rigidità del treno posteriore; fatti che andarono di mano in mano facendosi più spiccati fino quasi a raggiungere l'intensità che presentavano 15-20 giorni dopo l'inoculazione. Somministrato di nuovo il cibo, in ambedue i cani cessarono i fenomeni neuromuscolari già dopo 4 giorni.

Questa esperienza è di un valore dimostrativo assoluto: essa prova in modo indubbio che l'emanazione del tossico da parte delle spore è continua.

La cellula nervosa normale ha potuto in questi cani in cui come si è detto, il materiale inoculato era scarso e quindi poco il tossico circolante, adattarsi e riacquistare una funzionalità normale o quasi: ma è bastato l'intervento di una causa debilitante perchè essa ritornasse subito a subire l'influenza nociva del tossico circolante.

Ed un' altra esperienza noi abbiamo praticato.

Ad un cane inoculato pure con 4 cariossidi ed in cui erano cessati i fenomeni neuromuscolari abbiamo asportato una tiroide.

Dopo 3 giorni si ripresentò il quadro solito che cessò dopo una diecina di giorni.

Messo l' animale a digiuno i fenomeni dopo alcuni giorni comparvero di nuovo per cessare coll' alimentazione.

Evidentemente in questo cane l' ablazione di una tiroide ha diminuito transitoriamente il potere di resistenza delle cellule nervose corticali: da ciò il riapparire dei fenomeni i quali sono scomparsi quando la tiroide intatta aumentando la sua funzionalità ha ripristinato l' equilibrio organico.

Il digiuno ha poi di nuovo diminuito, come nelle due esperienze descritte sopra, la funzionalità della cellula nervosa.

Riassumendo quindi risulta anzitutto dalle attuali ricerche che le spore aspergillari in determinate condizioni possono rimanere a lungo, anche per più mesi di seguito, nell' organismo animale e conservare quasi immutato il loro potere vitale e patogeno.

In secondo luogo risulta da queste esperienze che un animale pur presentando un adattamento ai tossici emanati da una determinata quantità non mortale di spore, può però in seguito, dopo un periodo più o meno lungo di miglioramento, presentare dei fenomeni di riacutizzazione, qualora la sua resistenza organica venga in qualche modo intaccata, come p. es. si è osservato nel prolungato digiuno.

Quale conclusione d' indole generale dovremo noi quindi in seguito a questi fatti ammettere che le forme di pellagra dovute prevalentemente ad un'infezione da spore da *Aspergillus fumigatus* possano anche dopo un periodo più o meno lungo di miglioramento, di remissione dei fenomeni morbosi, presentare in seguito solamente ad una causa debilitante qualsiasi e che diminuisca e tolga quel grado di resistenza organica naturale o acquisita ai tossici pellagrogeni, presentare una riacutizzazione del morbo stesso.

Una riacutizzazione dei sintomi pellagrosi può esser quindi anche indipendente da una seconda infezione, ma dovuta sempre alle stesse spore non ancora eliminate dall' organismo.

---

